

Ultraschographische Charakterisierung kongenitaler Anomalien infolge der Zika Virus-Infektion im Mausmodell

von Dominik Christian Forster

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Ultrasonographische Charakterisierung kongenitaler
Anomalien infolge der Zika Virus-Infektion im Mausmodell**

von Dominik Christian Forster

aus Eichstätt i.Bay.

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Virologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Mitbetreuung durch: Priv.-Doz. Dr. Asisa Volz

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Johann Maierl

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Meiner lieben Familie

Für Hilde, Werner und Mimi

Für Hendrik

Für Melanie

Die vorliegende Arbeit wurde gemäß §6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in kumulativer Form verfasst.

Folgende wissenschaftliche Arbeit ist in der Dissertationsschrift enthalten:

Dominik Forster, Jan Hendrik Schwarz, Katrin Brosinski, Ulrich Kalinke, Gerd Sutter und Asisa Volz

„Obstetric ultrasonography to Detect Fetal Abnormalities in a Mouse Model for Zika Virus Infection”, erschienen in *Viruses*, 2020 (doi: 10.3390/v12010072).

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Arboviren	3
1.1.	Genus Flavivirus	4
1.2.	Aufbau und Morphologie des Zika Virus	6
1.3.	Replikationszyklus des Zika Virus	10
1.4.	Geschichte des Zika Virus	12
1.5.	Ausbreitung im Pazifik	14
1.6.	Ausbruch auf dem amerikanischen Kontinent 2015/2016	15
1.7.	Klinik und Pathogenese der Zika Virus-Infektion	16
1.7.1.	Neurotropismus und Guillain-Barré-Syndrom	18
1.7.2.	Fetotropismus und Kongenitales Zika Syndrom	19
1.8.	Kreuzreaktivität und -protektion	23
1.9.	Evolution des Zika Virus	24
1.10.	Weiteres Ausbreitungspotenzial und aktueller Stand	25
1.11.	Therapie und Gegenmaßnahmen	27
1.12.	Plazentaschranke als Hindernis für Zika	29
2.	Tiermodelle für die Zika-Infektion	31
2.1.	Mausmodelle	32
2.1.1.	Immunkompetentes Mausmodell	33
2.1.2.	Typ-I-Interferon-Rezeptor-defizientes (IFNAR-/-) Mausmodell	34
2.1.3.	Auswirkungen des Gestationsstadiums im Tiermodell	36
2.2.	Nicht-menschliches Primatenmodell	37
2.2.1.	Kongenitales Zika Syndrom in Nicht-menschlichen Primaten	38
2.3.	Ultraschographische Pränataldiagnostik	39
III.	ZIELSETZUNGEN	41
IV.	ERGEBNISSE	43
V.	DISKUSSION	71
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	81
VII.	SUMMARY	83

VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	85
IX.	DANKSAGUNG	105

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADE	Antibody Dependent Enhancement (Infektionsverstärkende Wirkung von Antikörpern)
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C-Protein	Capsid- (Kapsid-) Protein
CDC	Centers For Disease Control And Prevention (USA)
CHIKV	Chikungunya Virus
CZS	Congenital Zika Syndrome (Kongenitales Zika Syndrom)
DENV	Dengue-Fieber Virus
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
E-Protein	Envelope- (Hüll-) Protein
ED	Embryonic Day (Tag der embryonalen Entwicklung)
i.m.	Intramuskulär
IFN	Interferon
IUGR	Intra-Uterine Growth Restriction (Intrauterine Wachstumsverzögerung)
kDa	Kilodalton
M-Protein	Matrix-Protein
ml	Milliliter
NHP	Non-Human-Primate (Nicht-Menschlicher Primat)
NSP	Nichtstruktur-Protein
ORF	Open Reading Frame (Offener Leserahmen)

PBS	Phosphate-Buffered-Saline
RT-PCR	Reverse-Transcription-Polymerase-Chain-Reaction (Reverse-Transkriptase-Polymerase- Kettenreaktion)
PFU	Plaque-Forming Unit
PrM-Protein	Precursor-Matrix-Protein (Vorläufer-Matrix-Protein)
RdRp	RNA-Abhängige RNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
SP	Strukturprotein
ssRNA	Einzelsträngige Ribonukleinsäure
USI	Ultrasound Imaging
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
WNV	West-Nil Virus
YFV	Yellow-Fever Virus = Gelbfieber Virus
ZIKV	Zika Virus

I. EINLEITUNG

Im Jahr 1947, nach der Entdeckung des Zika Virus (ZIKV) durch den schottischen Virologen George WA Dick und seine Mitarbeiter, rechnete noch niemand mit dessen folgenschweren Ausbrüchen in den letzten Jahren (DICK et al., 1952). Die so noch nie da gewesene Größe der Epidemie 2015/2016 in Brasilien war die Folge des Eintrags des Virus in eine immunologisch-naive und damit empfängliche Bevölkerung. Seine rasche Ausbreitung und der vermutete Zusammenhang mit kongenitalen Störungen und dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS) führten zu enormer Resonanz, einschließlich der Erklärung zum globalen Gesundheitsnotstand durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) (ORGANIZATION, 2016a). Das Interesse am Verständnis der ZIKV-Pathogenese und der Verhinderung seiner fatalen Folgen nahm explosionsartig zu. Bis heute folgten mehr als 7000 diesbezügliche wissenschaftliche Publikationen und die Entwicklung mehrerer ZIKV-Impfstoffkandidaten (MORAIN et al., 2017). Während des Ausbruchs in Südamerika war die Mikrozephalie das vorherrschende klinische Merkmal fetaler ZIKV-Infektionen (BRASIL et al., 2016). Tausende Säuglinge wurden obendrein mit diversen anderen infektionsbedingten zerebralen Beeinträchtigungen geboren, was ihre neurologische Entwicklung aller Wahrscheinlichkeit nach stark einschränken wird (DELANEY et al., 2018).

Bei Verdacht auf eine ZIKV-Infektion schwangerer Frauen empfiehlt die CDC (Centers for disease control and prevention) die wiederholte Ultraschalluntersuchung des Fetus, um mögliche ZIKV-bedingte Missbildungen frühzeitig zu erkennen. Bei durch die Infektion geschädigten Feten wurden vor allem Ventrikulomegalie im Großhirn, Hypoplasie des Kleinhirns, Verkalkungen und Myelinisierungsdefekte diagnostiziert (CAO et al., 2017; ADAMS WALDORF et al., 2018). Über die zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen der ZIKV-induzierten Schädigung des Fetus wissen wir allerdings noch relativ wenig (RUSSO et al., 2017). In Anbetracht der in den letzten Jahren durch erworbene Immunität deutlich sinkenden Fälle humaner Infektionen, wird es sich als schwierig erweisen, die sich in Entwicklung befindlichen Gegenmaßnahmen weiter zu evaluieren und

klinische Studien im Menschen voranzutreiben. Aus diesen Gründen werden Tiermodelle der ZIKV-Infektion weiter eine wichtige und zentrale Rolle spielen, um neue Einsichten in die Pathogenese der ZIKV-Infektion während der Schwangerschaft zu erhalten, und dadurch universell einsetzbare und praktikable Therapien und Impfstoffkandidaten zu entwickeln.

Für den Menschen ist die pränatale Ultraschalluntersuchung sehr gut etabliert und findet routinemäßige Anwendung. Im Zuge dieser Arbeit wurde die sonographische Untersuchung verwendet, um die ZIKV-induzierte Pathogenese im schwangeren Typ-I-Interferonrezeptor-defizienten (IFNAR^{-/-}) Mausmodell näher zu evaluieren und zu charakterisieren. Die Etablierung dieser Untersuchungsmethode soll die Grundlage dafür schaffen, in kommenden Studien dann auch die potenzielle Schutzwirkung von Therapeutika und Impfstoffen besser quantifizieren zu können.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Arboviren

Das Wort Arbovirus ist ein Akronym für „arthropode-borne viruses“. Es beschreibt also Viren, die durch Arthropoden getragen werden. Diese Viren zirkulieren in der Natur durch biologische Übertragung zwischen einem empfänglichen Wirbeltier (Wirt) und einem blutsaugenden Arthropoden (Vektor) wie Stechmücken oder Zecken. Voraussetzung für die Vektorübertragung ist, dass das Virus eine hohe Virämie im Wirbeltierwirt hervorruft und sich in Geweben eines Arthropoden, zum Beispiel in Darmepithelzellen und Speicheldrüsen, vermehren kann (MODROW und FALKE, 1997). Eine ausreichende Virämie wird im Wirt normalerweise für 2 bis 6 Tage nach erfolgter Inokulation erreicht, um den Vektor per Blutmahlzeit infizieren zu können. Daraufhin infiziert das Virus die Zellen des Mitteldarms und breitet sich im nächsten Schritt auf die Hemozele und eine Vielzahl von Geweben aus, einschließlich der Speicheldrüsen. Die Infektion der Speicheldrüsen markiert den Zeitpunkt, an dem die Mücke infektiös wird. Während der Blutmahlzeit und der damit verbundenen Injektion von infektiösem Mückenspeichel kommt es zur Infektion des Wirtes (MODROW und FALKE, 1997). Neben dieser sogenannten horizontalen Übertragung gibt es auch Berichte über andere Übertragungsweisen, zum Beispiel durch vertikale Übertragung von der Mutter auf das Kind (BASURKO et al., 2009), durch Bluttransfusionen (TAMBYAH et al., 2008) und über Geschlechtsverkehr (OSTER et al., 2016).

Viele Arboviren verursachen Zoonosen und sind meist auf sogenannte Reservoir-Tiere (Wirtstiere, in denen sich die Erreger vermehren und entwickeln können) angewiesen (GUBLER, 2002). Zu den Arboviren rechnet man verschiedenste Viren. Ein sehr prominenter Vertreter ist das Genus der Flaviviren mit dem bekanntesten und zugleich namensgebenden Vertreter, dem Gelbfieber Virus (YFV).

In letzter Zeit gab es eine Reihe von Wiederauferstehungen bekannter Arboviren wie dem West-Nil Virus (WNV), dem Dengue-Fieber Virus (DENV), dem Chikungunya Virus (CHIKV) und erst kürzlich dem Zika Virus (ZIKV) (GUBLER, 2002).

Die Fähigkeit von Arboviren, sich an neue Vektoren anzupassen, erklärt deren große geographische Verbreitung. Im Laufe der Zeit haben sie sich an die hauptsächlich an den Menschen gebundenen Stechmücken *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* angepasst (GUBLER, 1998). Arboviren wie DENV sind mittlerweile vollständig an den Menschen adaptiert und zeichnen sich unter anderem durch urbane Zyklen in tropischen Stadtzentren aus (GUBLER, 2002).

Außerdem können genetische Veränderungen (WEAVER und REISEN, 2010), Klimawandel (GOULD und HIGGS, 2009), zunehmende Verstädterung und Globalisierung und der Mangel an wirksamen Mückenkontrollen Gründe für das vermehrte Aufkommen von Arboviren sein.

1.1. Genus Flavivirus

Die Familie der Flaviviridae umfasst drei Genera: Flavivirus, Pestivirus und Hepatitis-C Virus. Aus dieser Familie sind nur die Flaviviren von Vektoren wie blutsaugenden Mücken und Zecken abhängig. Vermutlich haben sich Flaviviren ursprünglich aus vektor-unabhängigen Viren entwickelt, von denen sich einige im Laufe der Zeit an verschiedene Arthropoden-Überträger angepasst haben (GOULD et al., 2003). In seltenen Fällen können Flaviviren auch ohne direkten Vektor unmittelbar von Wirbeltier zu Wirbeltier übertragen werden, wie beispielsweise Vertreter der Rio-Bravo-Virus-Gruppe (KUNO, 2001).

Die Gattung Flavivirus ist aus 89 Virusarten zusammengesetzt. Alle Mitglieder haben einzelsträngige RNA-Genome mit positiver Polarität ((+) ssRNA) mit ähnlicher Gensequenz-Reihenfolge (LINDENBACH et al., 2013). Im Allgemeinen besteht das Virion aus einer vom Wirt stammenden Membranhülle und dem Nukleokapsid, welches das Virusgenom enthält (COLPITTS, 2016).

Flaviviren verursachen auf allen Kontinenten eine hohe Morbidität und Mortalität (GUBLER, 2002). Die durch Stechmücken übertragenen Viren

teilt man in zwei Hauptgruppen ein, die sich unter anderem durch ihre Klinik beim Menschen auszeichnen: Zum einen die „neurotrophen“ Flaviviren zu denen außerdem das Japanische-Enzephalitis Virus (JEV) und das WNV gehören, welche hauptsächlich zwischen Vögeln und Culex-Stechmücken zirkulieren, und zum anderen die „viszerotropen“ Flaviviren, welche YFV und DENV einschließen und die Fähigkeit haben, hämorrhagisches Fieber auszulösen. Diese haben in der Regel einen silvatischen Zyklus mit niederen Primaten und Aedes-Stechmücken (FIELDS et al., 2007).

Das bekannteste Mitglied der Gattung Flavivirus ist das YFV. Dessen verursachte „Gelbsucht“, welche früher in tropischen Regionen der Erde viele Todesfälle verursachte und erst durch die Entwicklung eines attenuierten Impfstoffs eingedämmt werden konnte, war für die Virusfamilie namensgebend (flavus, lateinisch für „gelb“). Es war der erste Erreger, bei dem nachgewiesen werden konnte, eine Krankheit beim Menschen auszulösen und gleichzeitig einen an Insekten gebundenen Übertragungsweg zu besitzen (FIELDS et al., 2007).

Sowohl durch Zecken als auch durch Mücken übertragene Flaviviren können innerhalb der Arthropoden vertikal übertragen werden. Sobald die Viren die Eierstöcke der Gliederfüßer infizieren, wird das Virus direkt über die Eier an deren Folgegeneration weitergegeben (MODROW und FALKE, 1997).

Um der Ausbreitung von Flaviviren entgegenzuwirken, ist die vordringlichste und scheinbar leichteste Maßnahme die Eindämmung der Vektoren. Außerdem gibt es gegen das YFV einen hochwirksamen Impfstoff auf der Basis einer attenuierten Variante des Gelbfieberevirus. Darüber hinaus gibt es einen DENV Impfstoff, der jedoch zu einigen Bedenken hinsichtlich unerwünschter Wirkungen führte (THE LANCET INFECTIOUS, 2018) und zugelassene JEV-Impfstoffe, die im Gegensatz dazu sicher und relativ wirksam sind (LI et al., 2014). Allerdings gibt es für WNV und ZIKV noch keine zugelassenen Impfstoffe oder Therapeutika, die eine Infektion verhindern könnten. Somit besteht großer Bedarf an einem besseren Verständnis der Flavivirus-Biologie, um die damit verbundenen Gefahren besser kontrollieren zu können (BARROWS et al., 2018).

Durch das große mediale Interesse an ZIKV erhielt die Flavivirus-Forschung

wieder neuen Aufschwung. Trotz der fokussierten Forschung sind die zugrundeliegenden pathogenen Mechanismen noch nicht ganzheitlich geklärt und verstanden. Um zielführend neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, ist es daher essentiell, ein besseres Verständnis der ZIKV-Biologie zu erhalten, vor allem in Punkten wie dessen Struktur, Funktion und infolgedessen dessen genauer Pathogenese.

1.2. Aufbau und Morphologie des Zika Virus

ZIKV ist ein durch Stechmücken übertragenes 40-50 nm großes, behülltes, nichtsegmentiertes Flavivirus mit einem 10794 bp langen, einzelsträngigen RNA-Genom positiver Polarität ((+) ssRNA) (PIERSON und DIAMOND, 2013). Wie bei anderen Flaviviren exprimiert das Genom drei Strukturproteine und sieben Nicht-Strukturproteine, die als Polyprotein in einem einzigen langen „Open Reading Frame“ (ORF, offener Leserahmen) codiert sind. Der ORF wird am 5'- und 3'-Ende von nicht-translatierten Nukleotidfolgen flankiert. Die Genomorganisation von Flaviviren hinsichtlich der Reihenfolge der Proteinexpression lautet: 5'-C-PrM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (LINDENBACH et al., 2013).

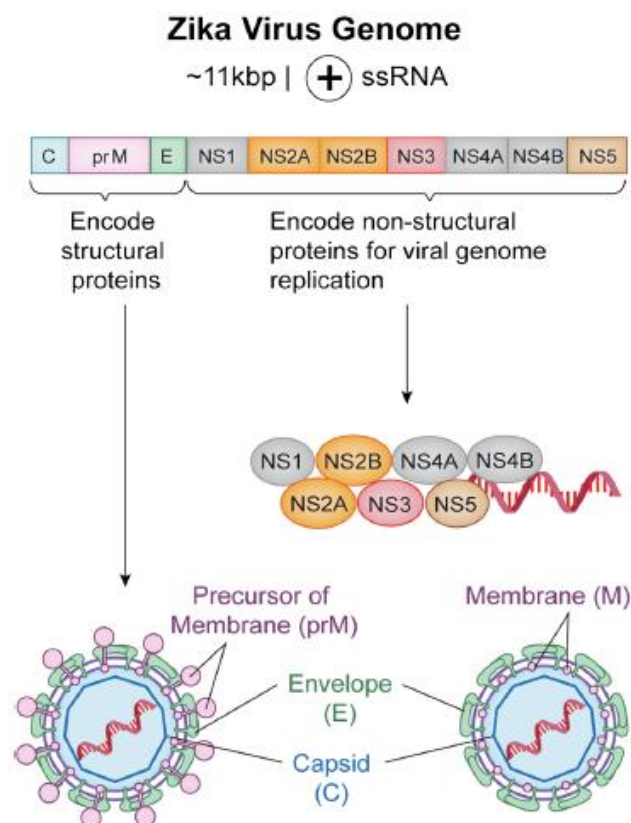


Abbildung 1: **Genom des Zika Virus** (Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der

Springer Nature Customer Service Center GmbH, *Journal: Neurotherapeutika, Titel: Therapeutic Approaches for Zika Virus Infection of the Nervous System, Autor: Rachel P. M. Abrams et al., © 2017*)

Das Genom ist durch ein sphärisches, ikosaedrisches Kapsid geschützt, welches aus den Kapsid- (Capsid-, C-) Proteinen gebildet wird. Das (+) ssRNA-Genom steht mit den stark basischen Aminosäuren (AS) an der Innenseite des Kapsids in enger Wechselwirkung und bildet mit diesen das sogenannte Nukleokapsid. Das carboxyterminale Ende des C-Proteins ist stark hydrophob und steht im reifen Viruspartikel mit der umhüllenden Lipid-Doppelschicht-Membran in Kontakt, in die zwei virale Oberflächenproteine eingelagert sind, das Membran- (M-) und das als Dimer vorliegende Hüll- (Envelope-, E-) Protein. Das M-Protein ist mit einem Molekulargewicht von 7 bis 8 kDa relativ klein im Gegensatz zum oberflächlich liegenden, dominierenden 51-60 kDa großen E-Protein, welches spezifisch ist für den jeweiligen Flavivirustyp (ABRAMS et al., 2017).

Davor wird das M-Protein als größeres glykosyliertes Vorläuferprotein (Precursor-M, PrM) exprimiert (ABRAMS et al., 2017). Die mögliche Glykosylierung des E-Proteins stellt eine Determinante der Neuroinvasion dar, die sowohl den axonalen als auch den transepithelialen Transport erhöht (NEAL, 2014).

Der im RNA-Genom enthaltene ORF dient dazu, ein großes vorläufiges Polyprotein zu synthetisieren, welches im Verlauf der Infektion in die einzelnen Komponenten gespalten wird (ABRAMS et al., 2017). Obwohl das Virus schon viele Jahre zuvor entdeckt wurde, ist die Funktion der einzelnen translatierten ZIKV-Proteine bei weitem noch nicht hinreichend geklärt. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über deren bekannte und vermutete Aufgaben gegeben werden.

Das C-Protein wird nach Abspaltung vom translatierten Polyprotein ins Zytoplasma freigesetzt und bildet dort Homodimere (LOBIGS, 1993). Es wirkt als Signalpeptid für das PrM-Protein und ist damit für die Inkorporation des in Translation befindlichen Polyproteins in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verantwortlich. Außerdem induziert es die initiale Proteinspaltung durch zelluläre Signalpeptidasen und fungiert

zusätzlich zu seiner Rolle bei der Bildung des viralen Nukleokapsids als RNA-Chaperon (ein Protein, das der RNA dabei hilft, sich richtig zu falten) (MA et al., 2004).

Das PrM-Protein ist der Vorläufer des sehr kleinen in der Virusmembran verankerten M-Proteins. Es ist mit 20-30kDa noch deutlich größer als das reife M-Protein (7-8kDa) im infektiösen Partikel. Der aminoterminaler Anteil des PrM Proteins wird erst bei der späteren Virusreifung während der Passage durch den Golgi-Apparat durch eine furinähnliche, zelluläre Protease abgespalten. Die M- und die E-Proteine sind in ikosaedrischer Symmetrie angeordnet, bestehend aus 60 Wiederholungen (ABRAMS et al., 2017).

Als zweites Membranprotein ist das glykosylierte E-Protein in der Hülle verankert. Es liegt als Dimer vor und ist über eine hydrophobe AS im carboxyterminalen Bereich mit der Lipidmembran verankert, liegt ihr flach auf und bestimmt durch seine unterschiedliche Faltung (vor und nach Reifung) die Größe des Partikels. Das E-Protein fungiert als Oberflächenprotein und spielt bei der Adsorption des Virus an die Rezeptoren der Zielzellen und beim Membranfusionsprozess eine wichtige Rolle (LINDENBACH und RICE, 2003). Im Verlauf der Flavivirus-Infektion werden insbesondere gegen das E-Protein virusneutralisierende Antikörper gebildet, welche den Wirt für gewöhnlich vor einer erneuten Infektion mit demselben Serotyp schützen (ABRAMS et al., 2017).

Das NS1 ist mit der Zellmembran assoziiert und wird obendrein teilweise durch Sekretion aus der Zelle abgegeben. Es gibt Hinweise, dass das membrangebundene NS1 Protein als Dimer und die sezernierte Form als Hexamer vorliegt (ABRAMS et al., 2017). Innerhalb der Zelle spielt NS1 eine Schlüsselrolle bei der Virusreplikation, während das membrangebundene NS1 zur Auslösung von Immunantworten sezerniert wird (MACKENZIE et al., 1996). Die Funktion des Proteins während der Infektion ist allerdings noch umstritten. Es gibt Hinweise, dass es am intrazellulären Transport der viralen SPs und an der Virusfreisetzung beteiligt ist. Es ist ein hochkonserviertes Protein unter den Flaviviren. Seine Größe hängt vom Glykosylierungsgrad ab, welcher ausschlaggebend für die Virulenz des Virus ist (PRYOR und WRIGHT, 1994; CRABTREE et al., 2005). Spezifische Antikörper gegen das NS1-Protein sind in der Lage eine

antikörpervermittelte Lyse infizierter Zellen einleiten und somit Schutzwirkung zu vermitteln (BRAULT et al., 2017).

NS2A ist ein multifunktionales, hydrophobes Protein, das an der RNA-Replikation beteiligt ist (CHAMBERS et al., 1989). Es ist membrangebunden und spielt bei der Kontrolle der antiviralen Interferonantwort des Wirts und darüber hinaus beim Entlassen von reifen Virionen aus der Zelle eine wichtige Rolle (LIU et al., 2006).

Das hydrophobe NS2B arbeitet bei der Virusreplikation auf der ER-Membran als essentieller Cofaktor mit der C-terminalen Domäne der NS3-Protease zusammen, um die Spaltung des viralen Polyproteins zu ermöglichen (MACKENZIE et al., 1998; MILLER et al., 2006).

Das multifunktionale NS3 besteht unter anderem aus einer carboxyterminalen Helikase- und einer aminoterminalen Protease-Domäne, welche mit NS2B ein Heterodimer bildet. Die Helikase Aktivität wird benötigt, um das bei der Synthese des Genoms gebildete doppelsträngige RNA-Zwischenprodukt zu entwinden (BARROWS et al., 2018). Es ist somit an der Translation und Synthese des viralen Polyproteins und an der Genomreplikation beteiligt (BRUENN, 2003). Die Protease ist im Wesentlichen für alle Spaltungen in den Regionen des Polyproteins verantwortlich, die der NS3 Domäne folgen.

Die Funktionen des NS4A sind noch kaum erforscht. Es ist wohl mit zellulären Membranen verknüpft, dient als mitbestimmender Faktor bei der viralen Pathogenese und besitzt durch die Hemmung von Interferon-regulierenden Faktoren (IRFs) nachteiligen Einfluss auf die Interferonbildung und somit auf die Immunantwort der Zelle (LIANG et al., 2016).

Das NS4B ist unter den Flaviviren schlecht konserviert und noch ähnlich wenig untersucht wie das NS4A. Mehrfache Transmembrandomänen sind als hydrophobe Regionen vorhanden. Es ist mitunter an der Bildung des viralen Replikationskomplexes beteiligt (BUCKLEY und GOULD, 1988).

Das NS5 ist essentiell für die Replikation des RNA-Genoms und umfasst 2 Domänen, zum einen die carboxyterminale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) und zum anderen die aminoterminalen Methyltransferase, welche eine zentrale Rolle beim Capping Prozess spielt.

Genehmigung der Springer Nature Customer Service Center GmbH, *Journal: Neurotherapeutika, Titel: Therapeutic Approaches for Zika Virus Infection of the Nervous System, Autor: Rachel P. M. Abrams et al., © 2017*)

Im nächsten Schritt interagiert die 5'-Cap-Struktur des Genoms mit zellulären Ribosomen-Untereinheiten. Die Translation von viralen Proteinen aus der viralen RNA erfolgt anhand des ORF, um das große Polyprotein herzustellen, welches darauffolgend in die einzelnen viralen Proteine gespalten wird und im nächsten Schritt dabei hilft, das virale Genom zu vervielfältigen (ABRAMS et al., 2017).

Wenn nach begonnener Translation das C-Protein im aminoterminalen Bereich des Polyproteins vorliegt, kommt es zu einer kurzzeitigen Unterbrechung der Elongation der Peptidkette: Im carboxyterminalen Bereich des C-Proteins wirkt die hydrophobe Domäne als Signalpeptid, welches dazu führt, dass der gesamte Translationskomplex an die Membran des ER transportiert wird. Dort wird die wachsende AS-Kette durch die ER-Membran geschleust, wobei das Polyprotein durch die Transmembrandomänen in PrM- und E-Proteinen in der Lipidschicht verankert wird (ABRAMS et al., 2017).

Das „Zerschneiden“ des Vorläuferproteins in die einzelnen funktionell aktiven Bestandteile erfolgt zu Beginn noch durch eine zelluläre, mit der Membran des ERs assoziierte Protease, der sogenannten Signalase. Dieses Enzym schneidet an Erkennungsstellen zwischen den C-, PrM-, E- und NS1-Anteilen. Für die weiteren Spaltungen des Polyproteins ist die Protease-Domäne des später entstehenden Heterodimers NS2B-/NS3 verantwortlich (ABRAMS et al., 2017).

Nach der posttranslationalen Polyproteinverarbeitung wird das ursprüngliche virale RNA-Genom mithilfe der neu-synthetisierten NSPs, welche an der Bildung des Replikationskomplexes beteiligt sind, an der ER Membran repliziert (LINDENBACH und RICE, 2003).

Nach Fertigstellung des viralen Replikationskomplexes transkribiert als erstes die am C-Terminus des NS5 befindliche RdRp die (+) ssRNA in eine doppelsträngige (ds) RNA (WU et al., 2015). Als nächstes entwindet die NS3-Helikase die dsRNA in separate (+) und (-) ssRNA Stränge (LUO et

al., 2008). Der (-) ssRNA Strang wird dann von der RdRp wieder in dsRNA transkribiert (WU et al., 2015), welche dann durch die Helikase von NS3 entwunden und in individuelle (-) und (+) ssRNA umgebaut wird (LUO et al., 2008). Die resultierende (-) ssRNA wird dann verwendet, um daraus viele (+) ssRNA- Stränge zu transkribieren. Anschließend wird die neu synthetisierte (+) ssRNA von der Methyltransferase des NS5 methyliert und dadurch für das Virus-Assembling vorbereitet (WU et al., 2015). Während sich methylierte (+) ssRNA, C-, E- und prM-Proteine in der ER-Membran sammeln (YU et al., 2008), interagieren membranassoziierte C-Proteine über basische AS mit dem RNA-Genom und tragen zu dessen richtiger Faltung bei. Schließlich knospt das entstehende Nukleokapsid in das Lumen des ER, um mit den sich in der Membran befindlichen Heterodimeren aus E- und PrM-Proteinen virale Partikel zu formen (MA et al., 2004). Unreife Virionen haben einen Durchmesser von ca. 60nm und eine mit Trimeren aus jeweils einem E-Protein und zwei PrM-Proteinen besetzte „stachelige“ Oberfläche (sog. „Spikes“), bedingt durch die aus der Membran herausragende distale Fusionsschleife des E-Proteins (HEINZ und STIASNY, 2017). Die „Pr“-Domänen des PrM-Proteins bedecken die Fusionsschleife und verhindern dabei die vorzeitige pH-vermittelte E-Proteinfusion. Die unreifen Viruspartikel durchlaufen den Sekretionsweg des Wirts und knospen aus dem ER in den Golgi-Apparat und reifen dort auf ihrer Passage durch das trans-Golgi-Netzwerk. Durch den dortigen niedrigen pH-Wert kommt es zur strukturellen Reorganisation, welche die Spaltung des prM durch die Wirtsprotease Furin induziert (KUHN et al., 2002). Die weitere Reifung des Virus reduziert seinen Durchmesser auf ungefähr 50 nm. Schließlich fusionieren die Golgi-Vesikel mit der Zellmembran und setzen ihren infektiösen Inhalt an der Zelloberfläche frei (ABRAMS et al., 2017).

1.4. Geschichte des Zika Virus

Zum ersten Mal wurde im Jahr 1947 eine Zika Virus (ZIKV) Infektion in einem Rhesusaffen einer Gelbfieber-Forschungsstation nachgewiesen, welcher als eines der Markertiere, als ein sogenannter „sentinel monkey“, in den Bäumen gehalten wurde (DICK et al., 1952). Diese

Forschungsstation befand sich im Zika Wald von Uganda, Afrika, welcher schlussendlich namensgebend für das Virus war.

Bei routinemäßigen Temperaturmessungen zeigte Rhesusaffe (Nr. 766) 39,7 °C Fieber. Eine dabei entnommene Blutprobe wurde Mäusen intrazerebral und intraperitoneal verabreicht und außerdem einem anderen Rhesusaffen (Nr.771) subkutan injiziert. Nach 10 Tagen zeigten alle intrazerebral geimpften Mäuse Krankheitsanzeichen. Affe Nr. 766 hatte neben dem Fieber keine weiteren Symptome und Affe Nr. 771 zeigte nach Inokulation weder eine erhöhte Körpertemperatur noch andere Symptome. Aus dem Gehirn der kranken Mäuse wurde das aus Affe Nr. 766 stammende Virus isoliert und – nach dem dortigen Wald – „Zika Virus“ genannt (Stamm: ZIKV766). Nach Genesung des Affen Nr. 766 wurde von ihm Serum genommen (auch von Affe Nr. 771, 35 Tage nach Inokulation) und beide Seren konnten das Virus neutralisieren. Im Vergleich dazu konnten vorher entnommene Serumproben gegen den ZIKV766 Stamm keine neutralisierende Wirkung zeigen (MUSSO und GUBLER, 2016).

Beim Versuch im Zika-Wald YFV zu isolieren wurden im Januar 1948 dort Stechmücken gesammelt (DICK et al., 1952). Mit einem gepoolten Filtrat aus diesen *Aedes africanus*-Mücken beimpfte man Mäuse. Eine Maus starb am 6. Tag nach Inokulation und eine wurde am Tag 14 krank. Das Virus aus den Mücken wurde isoliert und als ZIKV E/1 Stamm bezeichnet. Der Rest des Stechmückenfiltrats wurde dem Rhesusaffen Nr. 758 subkutan injiziert. Dieser Affe blieb dabei asymptomatisch. Sein Blut wurde Mäusen intrazerebral injiziert, welche darauffolgend krank wurden und starben. Aus diesem Serum wurde der Stamm ZIKV758 isoliert. (MUSSO und GUBLER, 2016). Rhesusaffe Nr. 758 entwickelte neutralisierende Antikörper gegen das aus seinem Serum isolierte Virus, gegen das Virus aus Affe Nr.766 und das Virus aus *Aedes africanus* (ZIKV E/1 Stamm). Kreuzneutralisierungstests zeigten, dass sich ZIKV von YFV, DENV unterschied (MUSSO und GUBLER, 2016).

Das erste humane ZIKV-Isolat stammte 1954 von einer 10jährigen Nigerianerin (MACNAMARA, 1954). In ihrem Blut fand man jedoch auch zahlreiche Malaria Parasiten, was es erschwerte, dem Virus eine klinische Symptomatik zuzuordnen. ZIKV wurde zum ersten Mal 1969 außerhalb

Afrikas in Malaysia aus *Aedes aegypti* Mücken isoliert (MARCHETTE et al., 1969). Im Jahr 1977 wurden anschließend die ersten humanen Infektionen in Indonesien gemeldet (OLSON et al., 1981). Damals wurden noch keine möglichen Auswirkungen auf die internationale Gesundheit befürchtet, erst dann als das Virus von 2007 bis 2015 Ausbrüche im Pazifik verursachte und es begann, sich 2015 in ganz Amerika auszubreiten.

1.5. Ausbreitung im Pazifik

Auf den Yap-Inseln (7500 Einwohner) in Mikronesien meldeten 2007 Ärzte den Ausbruch einer Dengue-ähnlichen Krankheit. Sie vermuteten dahinter DENV, was durch einen DENV-Immunglobulin-M-Schnelltest auch scheinbar bestätigt wurde. (MUSSO und GUBLER, 2016). Allerdings hatten sie den Eindruck, dass die Krankheit sich vom klassischen Denguefieber unterschied, da neben Hautausschlag und Arthralgie zusätzlich auch noch leichtes Fieber und Bindehautentzündung beobachtet wurden (MUSSO und GUBLER, 2016). Es wurden Proben an CDC geschickt, welche darin vorhandene ZIKV-RNA nachweisen konnten. Der Ausbruch dauerte circa drei Monate. Es wird spekuliert, dass diese Epidemie durch einen neuen, virulenteren ZIKV-Stamm ausgelöst wurde, ähnlich zu den epidemischen DENV-Stämmen aus den Jahren zuvor (STEEL et al., 2010).

Gleichzeitig zum bisher größten gesehenen Ausbruch war dies das erste Mal, dass ZIKV außerhalb von Asien und Afrika nachgewiesen werden konnte (FAYE et al., 2014). Diese dort festgestellte Epidemiologie lies schon damals erahnen, welches weitere epidemische Potenzial ZIKV besitzen könnte.

In Französisch-Polynesien klagten Patienten im Oktober 2013 wieder über eine „Dengue-ähnliche“ Krankheit. Die Erkrankung ging einher mit niedrigem Fieber (38 °C), Handgelenks- und Fingerarthralgie, Kopfschmerzen und Hautausschlag (MUSSO und GUBLER, 2016). Diese Patienten wurden mittels reverser Transkriptase- (RT-) PCR negativ auf DENV, CHIKV und WNV getestet. Eine spezifische ZIKV-RT-PCR testete die Proben dagegen positiv (LANCIOTTI et al., 2008). Das dort ansässige Gesundheitsministerium meldete eine Zunahme der Patienten mit DENV-ähnlichen Symptomen und Hautausschlag. Dabei wurden ca. 19.000 Verdachtsfälle registriert. Durch die spezifische ZIKV-RT-PCR wurden 294

von 584 positiv getestet (CAO-LORMEAU et al., 2014). Insgesamt belief sich die Zahl auf ungefähr 30.000 Fälle (11,5% der Bevölkerung) (MUSSO et al., 2014b). Da sich die meisten Patienten mit asymptomatischen oder nur mildem Zika Fieber nicht in ärztliche Behandlung begaben, ist die tatsächliche Anzahl der Fälle nur spekulativ. Wahrscheinlich war der Grund für den Ausbruch die niedrige bestehende Bevölkerungsimmunität und die hohe Dichte an Stechmückenvektoren (AUBRY et al., 2015). Der Ursprung des Ausbruchs in Französisch-Polynesien ist unbekannt, obwohl das Virus enge Verwandtschaft zu den Stämmen auf den Yap-Inseln zeigte (CAO-LORMEAU et al., 2014). Das ZIKV breitete sich in den Jahren darauf schnell auf umliegende pazifische Inseln wie Neukaledonien, die Cook- und die Osterinseln aus (MUSSO et al., 2014b) aus.

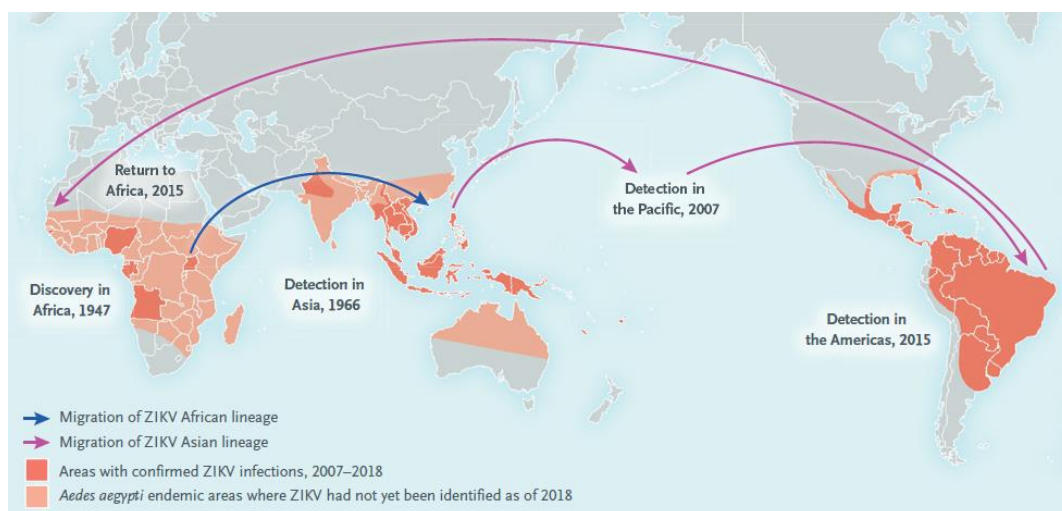


Abbildung 3: **Ausbreitungsgebiete von ZIKV und seinen Vektoren**; Bestätigte ZIKV-Infektionen zwischen 2007 und 2018 in Rot. *Aedes aegypti*-Endemiegebiete noch ohne nachgewiesenen ZIKV-Fall in Hellrot. Migration von afrikanischen (blauer Pfeil) und asiatischen (lila Pfeile) ZIKV-Stämmen. (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung von Musso et al., 2020, Copyright Massachusetts Medical Society)

1.6. Ausbruch auf dem amerikanischen Kontinent 2015/2016

Im Mai 2015 wurde das ZIKV zum ersten Mal in Südamerika bei einem fieberhaften Patienten nachgewiesen (MUSSO und GUBLER, 2016). Lange Zeit spielte das Virus nur eine relativ untergeordnete Rolle innerhalb der bekannten Tropenkrankheiten, bis zu dem Zeitpunkt, als vor ein paar Jahren die mit ZIKV-assoziierten Geburtsfehler in Brasilien zunahmen

(BRASIL et al., 2016). Zur selben Zeit wurde von einer potenziellen Assoziation zwischen selbiger Infektion und neurologischen Erkrankungen wie dem GBS berichtet, was die weit verbreitete Meinung, ZIKV sei nur eine relativ milde, selbstlimitierende Krankheit, in Frage stellte (DO ROSARIO et al., 2016).

Im Dezember 2015 wurde die Zahl von ZIKV-Verdachtsfällen bereits auf zwischen 440.000 und 1.300.000 Millionen geschätzt (HENNESSEY et al., 2016).

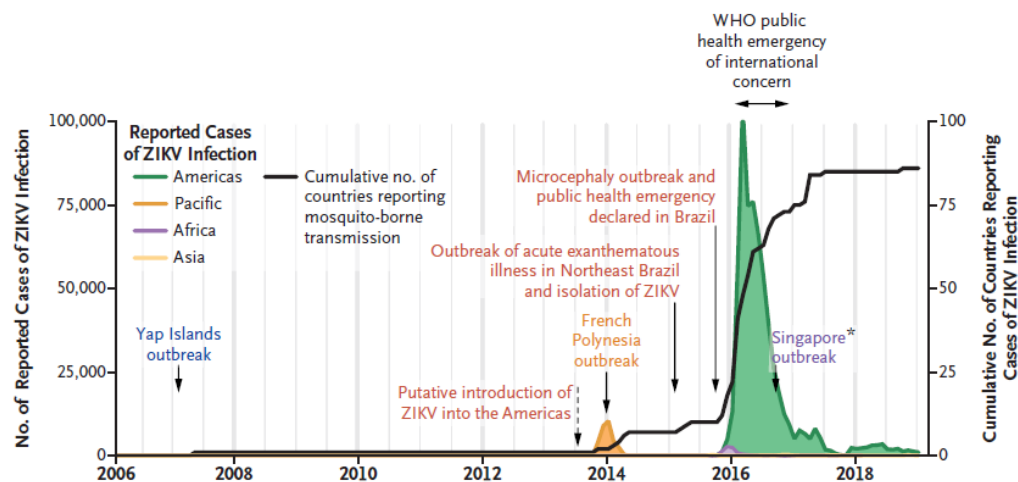


Abbildung 4: **ZIKV-Fallzahlen**; Anzahl gemeldeter Fälle von ZIKV-Infektionen in Amerika, den Pazifikinseln, Afrika und Asien; (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung von Musso et al., 2020, Copyright Massachusetts Medical Society)

Durch das sich rasant ausbreitende Virus und die vielen damit zusammenhängenden fetu- und neuropathologischen Fälle, wuchs die Angst vor den Folgen der ZIKV-Infektion (FAUCI und MORENS, 2016). Die Bedingungen für einen ZIKV-Ausbruch in Brasilien waren wie geschaffen, da dessen Vektoren *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* dort weit verbreitet sind (MARCONDES und XIMENES MDE, 2016), was dazu führt dass auch viele andere Arboviren wie YFV und DENV dort endemisch sind (NOGUEIRA et al., 2007).

1.7. Klinik und Pathogenese der Zika Virus-Infektion

Durch die vermehrten Fälle der durch ZIKV-ausgelösten Geburtsfehler und des GBS rückte das ZIKV immer mehr in den Fokus der Weltgesundheit. Im Allgemeinen (75 bis 80% der Fälle) zeigt sich die Zika-Infektion jedoch nur subklinisch bzw. asymptomatisch (COSTA et al., 2016). Unter den

klinischen Fällen ist das typische Bild ein mildes, unspezifisches, grippeähnliches Syndrom und ähnelt sehr dem anderer Flaviviren wie DENV und WNV. Es kommt zu leichtem Fieber, Arthralgien, Kopfschmerzen, Hautausschlag, Myalgien, Bindehautentzündung, Müdigkeit und retroorbitalen Schmerzen (PETERSEN et al., 2016). Die meisten symptomatischen ZIKV-Infektionen sind selbstlimitierend und verschwinden binnen einer Woche. Da ZIKV, WNV und DENV von denselben Vektoren übertragen werden können und gleichzeitig in den selben endemischen Gebieten zuhause sind, erschwert es die Grundlage für eine ZIKV-Diagnose rein aufgrund der Klinik (DUFFY et al., 2009).

Obwohl die meisten Infektionen wahrscheinlich durch Stechmücken übertragen werden, kann sich das Virus auch direkt von Mensch zu Mensch, zum Beispiel durch sexuellen Kontakt oder auch vertikal von Mutter zum Fetus ausbreiten (D'ORTENZIO et al., 2016). Musso et al. berichteten von einem Patienten, dessen Samen- und Urinproben noch 10 Wochen nach Auftreten der akuten Zika Symptome mittels RT-PCR und Genomsequenzierung positiv auf ZIKV getestet wurden, obwohl 2 aufeinanderfolgende Blutproben negativ waren (MUSSO et al., 2015a). Somit können Männer das ZIKV auch noch lange nach der akuten Infektion mit dem Samen übertragen (MANSUY et al., 2016), und fungieren somit als mögliches Langzeitreservoir.

Sowohl von Mann zu Frau als auch von Frau zu Mann wurde von sexueller Übertragung berichtet (DAVIDSON, 2016). Darüber hinaus kann Zika nosokomial unter anderem durch Bluttransfusionen übertragen werden (MUSSO et al., 2014a). Zusätzlich zum Blut wurde ZIKV aus menschlichem Urin (GOURINAT et al., 2015), Speichel (MUSSO et al., 2015b), Muttermilch (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2016) und Zervixschleim (PRISANT et al., 2016) isoliert.

Flaviviren zielen auf eine Vielzahl von Zelltypen ab, einschließlich dendritischer Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und neuronaler Zellen (BESNARD et al., 2014). Wahrscheinlich infiziert ZIKV bei den meisten Personen eine Untergruppe der Monozyten (MICHELMAYR et al., 2017) kann jedoch auch Zellen im Plazentagewebe (MINER et al., 2016b)

befallen, was infolgedessen zu schwerer neuronaler Infektion des Fetus führen kann (MLAKAR et al., 2016).

Es wurde unter der Verwendung von Säugetier-*in-vitro*-Modellen postuliert, dass das AXL-Protein ein wichtiger Rezeptor für das ZIKV ist (TABATA et al., 2016). In anderen Systemen infiziert ZIKV jedoch auch leicht neuronale AXL *-/-* Vorläuferzellen *in-vitro* (WELLS et al., 2016) und verursacht Pathogenese in einem AXL-Knock-Out- Mausmodell (MINER et al., 2016a), was zeigt, dass AXL nicht der einzige ZIKV-Rezeptor sein kann. Die Divergenz der Rezeptornutzung durch Zika stimmt dadurch mit der anderer Flaviviren überein (LAURETI et al., 2018).

Da vor der aktuellen Epidemie fast keine Laboruntersuchungen an Zika durchgeführt wurden und kaum Forschung betrieben wurde, ist das Verständnis seiner Pathogenese erst am Anfang. Teratogenität, sexuelle sowie vertikale Übertragung wurden bisher bei anderen Flaviviren nicht gesehen, was darauf hindeutet, dass diese Mechanismen für ZIKV spezifisch sein könnten. Dies unterstreicht einmal mehr die Notwendigkeit, ein besseres Verständnis für dieses neu auftretende Pathogen zu erlangen (LAZEAR und DIAMOND, 2016).

1.7.1. Neurotropismus und Guillain-Barré-Syndrom

Mehrere *in-vivo* und *in-vitro* Infektionsmodelle haben eindrucksvoll aufgezeigt, dass die neuronale Entwicklung durch ZIKV gestört werden kann (CUGOLA et al., 2016; TANG et al., 2016).

Neben der fetalen Pathologie wird die Erkrankung auch mit neurologischer Klinik in Verbindung gebracht, unter anderem wurden Fälle von Meningoenzephalitis und Myelitis beobachtet (FONTES et al., 2016).

Am auffälligsten war jedoch das durch ZIKV induzierte GBS. Erstmals wurde es im Zusammenhang mit der ZIKV-Infektion beim Ausbruch in Französisch-Polynesien 2013 beschrieben (CAO-LORMEAU et al., 2016). Diese akute entzündliche Polyradikuloneuropathie schädigt immunbedingt das periphere Nervensystem von Erwachsenen und manifestiert sich in verschiedenen von distal nach proximal voranschreitenden neurologischen Störungen, wie Muskelschwäche, schlaffer Lähmung und dem damit einhergehenden Verlust der Motorik. Infolge von Atemversagen,

Lungenentzündung, Lungenembolie, Sepsis oder (seltener) autonomer Dysfunktion kann der Patient als Sekundärfolge von GBS auch versterben (LAWN und WIJDICKS, 1999; DOS SANTOS et al., 2016). Die Inzidenz des ZIKV-assoziierten GBS wird auf 2 bis 3 Fälle aus 10.000 ZIKV-Infektionen geschätzt (MIER et al., 2018).

Durch die Gabe von therapeutischem Plasma und der intravenösen Verabreichung von Antikörpern kann man versuchen, der Erkrankung therapeutisch entgegenzuwirken (ORGANIZATION, 2016b).

1.7.2. Fetotropismus und Kongenitales Zika Syndrom

Wahrscheinlich war aufgrund ihrer dramatischen Erscheinung die Mikrozephalie die erste kongenitale Anomalie, die mit der ZIKV-Infektion in Verbindung gebracht wurde (SCHULER-FACCINI et al., 2016). Im April 2016 schloss die CDC, dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen vorgeburtlicher ZIKV-Infektion und den schwerwiegenden, angeborenen Hirn- und Schädelanomalien gibt (RASMUSSEN et al., 2016).

Eine Assoziation zwischen ZIKV und fetaler Mikrozephalie war überraschend, da Flaviviren im Menschen normalerweise nicht vertikal übertragen werden können. Die sogenannte Mikrozephalie beschreibt eine schwere Störung der fetalen Gehirnentwicklung, die zu kleinerer Kopfgröße führt und häufig mit kognitiven und physischen Beeinträchtigungen assoziiert ist. Während der Genese der ZIKV-induzierten Mikrozephalie werden die verantwortlichen Mechanismen der embryonalen Gehirnbildung gestört, die zu einem Wachstumsstillstand des Großhirns, zum partiellen Kollaps des Schädels und zu deutlicher Faltenbildung durch überflüssige Kopfhaut führen (CORONA-RIVERA et al., 2001).



Abbildung 5: **ZIKV-induzierte Mikrozephalie bei Neugeborenen;** (Wiedergabe (modifiziert) mit freundlicher Genehmigung von Musso et al., 2020, Copyright Massachusetts Medical Society)

Es wurde schon sehr früh deutlich, dass das ZIKV ein breites Spektrum an Entwicklungsstörungen, die über Mikrozephalie hinausgehen, verursacht. Als Folgen der fetalen Infektion treten unter anderem Plazentainsuffizienz und IUGR, Lissenzephalie, Hydranzephalie, Ventrikulomegalie, subkortikale Verkalkungen, Augenanomalien und sogar im äußersten Fall der Tod des Fetus auf (RASMUSSEN et al., 2016).

Unter dem Mikroskop erhielt man Hinweise auf eine veränderte Migration von Neuroprogenitorzellen, neuronale Apoptose und Läsionen in Strukturen der grauen Substanz (FRANCA et al., 2016). Das gesamte Erscheinungsbild dieser Symptome wurde unter dem Begriff „kongenitales Zika-Syndrom“ („Congenital Zika syndrome“, CZS) zusammengefasst. Das ZIKV konnte aus dem Fruchtwasser von Säuglingen mit bestätigter Mikrozephalie (CALVET et al., 2016) und aus dem Gehirn eines Fetus mit ZNS Anomalien isoliert werden (MLAKAR et al., 2016).

Durch die Fallstudie von Brasil et al. erhielt man den wahrscheinlich bis dato stärksten Hinweis auf die ZIKV-assoziierte Mikrozephalie. Dabei wurden Mütter mit einer akuten ZIKV-Infektion begleitet und die damit verbundenen Folgen bei Feten untersucht. Neben RT-PCRs aus Blut- und Urinproben wurden außerdem auch klinische und sonographische Daten erhoben. Der Zeitpunkt der akuten Infektion lag in einem Bereich zwischen der 5. Und der

38. Schwangerschaftswoche. Mittels fetaler Doppler-Sonographie konnte man bei 29% der Frauen fetale Anomalien nachweisen. Außerdem wurden spontane Aborte, fetaler Tod, unphysiologisches Fruchtwasservolumen, Plazentainsuffizienz, abnormaler Hirn- oder Nabelarterien-Blutfluss, Einschränkung des fetalen Wachstums (intrauterine growth restriction, IUGR) mit und ohne Mikrozephalie sowie fetale ZNS-Schädigung mit ventrikulärer Verkalkung berichtet (BRASIL et al., 2016).

Cauchemez et al. berichteten über eine vergleichsweise geringere Inzidenz von Mikrozephalie von etwa 1% (CAUCHEMEZ et al., 2016). Sie postulierten daneben eine Korrelation zwischen dem Trimester der ZIKV-Exposition und den fetalen Folgen.

In der Studie von Brasil et al. wurde festgestellt, dass 55% der Infektionen im ersten Trimester zu fetalen Anomalien führen, verglichen mit nur 29% während des dritten Trimesters (BRASIL et al., 2016). In den Vereinigten Staaten führte die mütterliche ZIKV-Infektionsdiagnose während des ersten, zweiten oder dritten Trimesters zu 6%, 5% oder 4% Raten von ZIKV assoziierten Geburtsfehlern (SHAPIRO-MENDOZA et al., 2017). Die Verwendung unterschiedlicher Definitionen der Mikrozephalie in voneinander unabhängigen Studien, hat zu diesen beobachtbaren Unterschieden der Inzidenz beigetragen.

Guillemette-Artur et al. beobachteten bei pränatalen Magnetresonanztomographie-Untersuchungen des fetalen Gehirns schwere, durch ZIKV-induzierte zerebrale Schäden (GUILLEMETTE-ARTUR et al., 2016). Es gab viele Hinweise dafür, dass das Hauptziel von ZIKV die germinale Matrixzone ist. Im fetalen Gehirn bilden sich dort ab der siebten Woche mitotisch Neuronen und Gliazellen, welche darauffolgend in die Großhirnrinde auswandern.

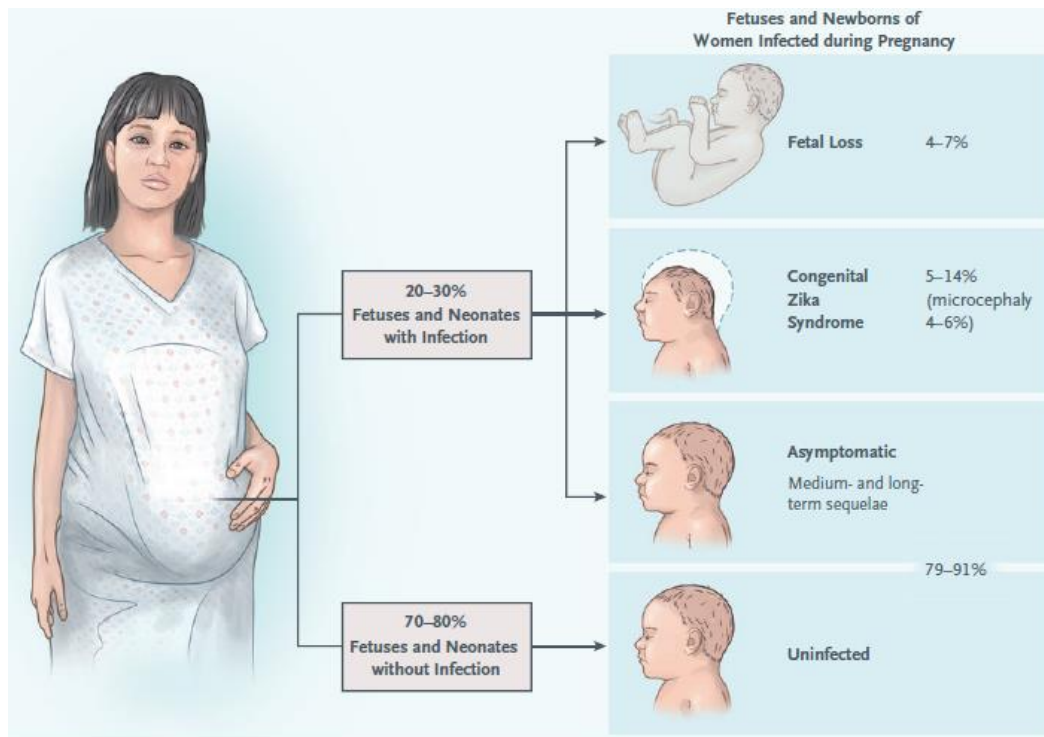


Abbildung 6: **Vertikale ZIKV-Übertragung und klinische Merkmale;** Komplikationen und Folgen der ZIKV-Infektion während der Schwangerschaft. Prozentsätze der maternal-fetalen Übertragung, des fetalen Verlusts, des Erscheinens des CZS und der ZIKV-assoziierten Mikrozephalie. Ohne Daten aus prospektiver Studie aus Rio de Janeiro, die einen hohen Prozentsatz (42%) der unerwünschten Ergebnisse bei Feten zeigte, deren Mütter mit ZIKV infiziert waren (BRASIL et al., 2016). (Wiedergabe (modifiziert) mit freundlicher Genehmigung von Musso et al., 2020, Copyright Massachusetts Medical Society)

Obwohl die Mikrozephalie als eines der markantesten Merkmale des CZS gilt, kann es auch ohne diese offensichtliche morphologische Anomalie zum CZS kommen (VENTURA et al., 2016b). Langfristige Beeinträchtigungen wie möglicher Hörverlust, Sehbehinderung, Epilepsie oder Entwicklungsverzögerungen sind kurz nach Geburt meist noch nicht ausmachbar und werden oft erst während der späteren Entwicklung des Kindes diagnostiziert (VAN DER LINDEN et al., 2016). Diese Tatsache unterstreicht die Notwendigkeit, betroffene Säuglinge auch nach der Geburt noch langfristig zu überwachen. Um die möglichen Folgen und das gesamte Spektrum der CZS-Manifestationen abzusehen, sind Langzeitstudien unverzichtbar, insbesondere wenn es darum geht, subtilere Folgen, wie kognitive Störungen oder ähnliche Komplikationen, zu erkennen.

1.8. Kreuzreaktivität und -protektion

Angesichts der gleichsamten Präsenz des Zika Virus in Regionen, in denen DENV endemisch zirkuliert, ist es von elementarem Interesse, mehr über die immunologische Kreuzreaktivität beider Viren herauszufinden. Speziell im Flavivirus-Feld ist das Prinzip der infektionsverstärkenden Antikörper („antibody dependent enhancement“, ADE) ein weit bekannter Begriff. Das populärste Bild der ADE wird wohl im Zusammenhang der vier DENV-Serotypen gesehen. Hier führt bei vorheriger Infektion mit einem der vier Serotypen eine später auftretende Re-Infektion mit einem unterschiedlichen DENV-Subtyp zu einem schwereren Krankheitsverlauf bis hin zum hämorrhagischen Syndrom (HALSTEAD, 1979). Grund hierfür sind Antikörper, die während der ersten Infektion gebildet wurden, welche nun für den jeweiligen neuen, fremden DENV-Subtyp insuffizient sind. Sie binden den neuen Subtyp zwar, können ihn aber nicht neutralisieren. Sie führen viel mehr dazu, dass das Virus verstärkt in Makrophagen und Monozyten aufgenommen werden kann und es zu deren Infektion kommt. Daher ist es von grundlegendem Interesse, den möglichen Einfluss und die Auswirkungen etwaiger Kreuzreaktivität zwischen ZIKV-induzierten Antikörpern und DENV-Infektionen (und umgekehrt) zu untersuchen. Bisher gibt es allerdings noch keine Berichte über einen ADE-Zusammenhang zwischen DENV und ZIKV (HALSTEAD, 1979).

Neben der denkbaren Kreuzreaktivität wäre es möglich, dass auch eine Kreuz-*Protektion* bestehen könnte. In Blutspenden, welche 2011-2013 vor dem ZIKV-Ausbruch in Französisch-Polynesien gesammelt wurden, war die Prävalenz von Antikörpern gegen mindestens einen DENV-Serotyp 80,3% (MUSSO und GUBLER, 2016). Das weist darauf hin, dass eine hohe DENV-Seroprävalenz augenscheinlich nicht vor ZIKV-Ausbrüchen schützt. Viel mehr wurden Koinfektionen mit anderen Arboviren gemeldet, z.B. DENV-ZIKV während der HPF Ausbrüche und Neukaledonien und DENV-CHIKV-ZIKV in Kolumbien. Diese Beobachtungen zeigen somit auf, dass vorhergegangene DENV-Infektionen keine Schutzwirkung gegen ZIKV vermitteln (MUSSO und GUBLER, 2016).

Bei der Entwicklung von ZIKV-Impfstoffen ist es wichtig, mögliche Risiken und Nebenwirkungen bezogen auf die ADE präzise einschätzen zu können. Die Möglichkeit negativer Wirkungen impfinduzierter Antikörper erschwert die Ansätze der Impfstoffentwicklung erheblich. Bei Flavivirus-Infektionen werden hauptsächlich Antikörper gegen das E-Protein gebildet, so auch bei der DENV-Infektion (HEINZ und STIASNY, 2017). Diese Oberflächenantikörper sind hauptverantwortlich für Mechanismen der ADE. Somit ist es elementar wichtig, bei der Entwicklung von Impfstoffkandidaten gegen das ZIKV einer möglichen Kreuzreaktivität gegen gleichzeitig auftretende DENV-Infektionen vorzubeugen und aus diesem Grund als Lösungsansatz möglicherweise andere Antigenkombinationen zu erwägen.

1.9. Evolution des Zika Virus

Als das Zika Virus Mitte des 20. Jahrhunderts entdeckt wurde, rechnete man noch kaum mit dessen schwerwiegenden Folgen. Das damals klinisch noch relativ unbedeutende Virus hat sich über Jahrzehnte zum heutigen epidemischen Virusstamm inklusive kongenitaler und neuronaler Störungen entwickelt. Ein möglicher Grund hierfür könnten Genom-Mutationen sein, die den relativ harmlosen klinischen Phänotyp des Prototyp-Virusstamms aus Uganda veränderten und die Virulenz und Pathogenität des Virus steigerten.

Die fehlende „Proof-Reading“-Aktivität der NS5-RdRp von ZIKV stützt diese Hypothese, was dazu führt, dass das Genom große Sequenzvariationen zwischen einzelnen Virusstämmen aufzeigt (MUSSO und GUBLER, 2016). Es wurden mithilfe von Computeranalysen der Nukleotidsequenzen des NS5 insgesamt 4 ZIKV-Linien (Asiatische, Ostafrikanische, Westafrikanische und Amerikanische Linien) identifiziert. Bei diesen vergleichenden Genomanalysen zwischen früheren ZIKV-Stämmen und den heutigen Epidemiestämmen fand man erhebliche Sequenzunterschiede (KUNO und CHANG, 2007). Die Mutmaßungen, dass sich ZIKV vom Pazifik aus nach Brasilien ausbreitete und die epidemischen ZIKV-Stämme über genetische Variation aus dem asiatischen Stamm hervorgegangen sind, werden weiter durch epidemiologische und phylogenetische Studien gestützt (FARIA et al., 2016).

Es wurde bereits früher davon berichtet, dass Mutationen anderer Flaviviren die Replikationseffizienz, den Wirtstropismus und die Virulenz verändern können und somit zu veränderter Epidemiologie führten (ZHU et al., 2016). Höchstwahrscheinlich sind auch bei ZIKV zwei derartige genetische Veränderungen aufgetreten, einer auf den Yap-Inseln und der andere in Französisch-Polynesien. Der dabei entstehende Stamm besaß größere Virulenz, führte somit zur Epidemie in Brasilien und breitete sich darauffolgend auf verschiedene andere amerikanische Länder aus (FARIA et al., 2016; MUSSO und GUBLER, 2016).

Noch immer nicht geklärt ist, ob die vergleichsweise schwerwiegenden Komplikationen neu auftretende Phänomene waren oder schon seit jeher bestanden. Eine Erklärung für die neuartig erscheinende Klinik könnte die hohe Fallzahl sein (MUSSO und GUBLER, 2016). Es besteht die Möglichkeit, dass seltene Ereignisse wie beispielsweise die Entstehung von GBS oder der Mikrozephalie erst während einer auftretenden Epidemie leichter offensichtlich werden und bislang aufgrund fehlender Überwachung und seltenerer Fälle nur nicht bemerkt wurden (BAUD et al., 2017).

Berichte, sowohl aus *in-vitro* als auch aus *in-vivo* Studien, legen nahe, dass die Infektiosität und das Risiko für Mikrozephalie durch entstehende Zufallsmutationen gesteigert werden könnte (LIU et al., 2017). Allerdings waren verschiedene andere ZIKV-Stämme, welche diese spezifischen Mutationen und pathogenspezifischen Marker für derartige Geburtsfehler nicht beinhalten, ebenso in der Lage, schwere perinatale Anomalien hervorzurufen (GRUBAUGH et al., 2019). Daher dürfen ZIKV-Stämme, bei denen solche bekannten Mutationen nicht nachgewiesen werden, *nicht* pauschal als risikoarm eingestuft werden, wie während des Ausbruchs in Indien 2018 vorgeschlagen wurde (MUSSO et al., 2020).

1.10. Weiteres Ausbreitungspotenzial und aktueller Stand

Eine effektive Ausbruchs-Epidemiologie wurde beeindruckend durch die in Südamerika erlebte ZIKV-Pandemie dargelegt, bei der ein neuartiger, aus der asiatischen Linie hervorgegangener ZIKV-Stamm in eine immunologisch-naive Bevölkerung eingeschleppt wurde und sich dort rasant mit gravierenden Folgen ausbreitete. Diese Pandemie zeigte

eindrucksvoll die Fähigkeit des Virus, sich mittels Aedes-Mücken und vernetzter menschlicher Mobilität effizient über weit verbreitete Regionen zu verteilen. Seit Ende 2016 sind in Amerika die registrierten ZIKV-Infektionen jedoch spürbar zurückgegangen. 2018 wurden weniger als 30.000 Fälle gemeldet im Vergleich zu mehr als 1.3 Millionen vermuteten und 500.000 registrierten Fällen im Jahr 2016 (MUSSO und GUBLER, 2016).

Ungeachtet dessen hatte das Virus nach dem Ausbruch in Südamerika bereits begonnen, sich über Brasilien hinaus weiter auszubreiten. Es wurde eine weltweite Ausbreitung befürchtet, da ZIKV in den USA, in Europa und in anderen Ländern bereits bei zurückkehrenden Reisenden nachgewiesen wurde (HILLS et al., 2016). In Gebieten mit potenziell kompetenten Vektoren stellen diese Fälle ein nicht zu unterschätzendes Ausbreitungsrisiko dar. Außerhalb Brasiliens ist die Anzahl der durch ZIKV-beeinträchtigten Schwangerschaften bisher jedoch noch recht gering geblieben, was höchstwahrscheinlich auf die bislang relativ geringe Zahl an Neuinfektionen in diesen Ländern zurückzuführen ist.

Es gibt viele Faktoren, die dazu beitragen, die tatsächliche globale Ausbreitung und die Fallzahlen von ZIKV zu unterschätzen (MUSSO und NHAN, 2015). Zum einen führt Zika nur zu einer asymptomatischen bis relativ milden Symptomatik, bei der die meisten Menschen kaum ärztliche Behandlung beanspruchen. Zum anderen tritt die Krankheit hauptsächlich in Gebieten auf, in denen Menschen nur sehr schlechten Zugang zu medizinischen Einrichtungen haben. Des Weiteren sind die für den Virus-Nachweis notwendigen Technologien und Infrastrukturen in den betroffenen Ländern meist nicht ausreichend ausgebaut.

Ähnlich wie beim Erreger des Dengue-Fiebers Virus wird vermutet, dass das ZIKV in einigen Gebieten wie Asien und Afrika schon unbemerkt zirkuliert (MUSSO und NHAN, 2015). Durch die entstandene Herdenimmunität der südamerikanischen Bevölkerung erscheint es fast so, als wären einige Regionen bereits wieder frei von ZIKV (FERGUSON et al., 2016),

Allerdings ist in der Vergangenheit auch schon des Öfteren ein erneutes Wiederauftreten epidemischer Arboviren zu beobachten gewesen (GUBLER, 2002). Das DENV ist mittlerweile in allen tropischen Regionen

der Welt endemisch und die Häufigkeit der Fälle hat sogar zugenommen (GUBLER, 2011). Verantwortlich für diese veränderte Epidemiologie, welche unter anderem auch bei WNV und CHIKV beobachtet wurde (WEAVER und LECUIT, 2015), ist ein Zusammenspiel aus vielen möglichen Faktoren. Die wichtigsten Größen waren das globale Bevölkerungswachstum, die zunehmende Verstädterung sowie die Globalisierung (GUBLER, 2002). Da die Ausbrüche unter anderem mit neuartiger Klinik und Übertragungsarten verknüpft waren, bekräftigt das die Hypothese, dass mitunter genetische Variationen verantwortlich für diese phänotypischen Veränderungen waren, die die Virulenz und das epidemische Potenzial beeinflussten (BENNETT et al., 2003; TSETSARKIN et al., 2007). Bisher wurde das für ZIKV noch nicht bestätigt, wäre aber die wahrscheinlichste Erklärung für sein dramatisches Auftreten in den letzten Jahren. Ebenso wie DENV und CHIKV hat sich ZIKV wahrscheinlich aus seinem ursprünglich silvatischen Zyklus an einen neuen urbanen Zyklus angepasst (MUSSO et al., 2015c).

Die weitere Entwicklung bleibt unvorhersehbar, aber aufgrund des gemeinsamen Vektors und der neuartigen Epidemiologie liegt es sehr nahe, dass sich ZIKV ähnlich wie DENV und CHIKV verhalten wird (MUSSO und GUBLER, 2016). Das Risiko der globalen Ausbreitung wird durch infizierte Menschen, die in Gebiete reisen, in denen für ZIKV-empfindliche Vektoren heimisch sind, drastisch erhöht (GUBLER, 2011). Die Pan American Health Organisation prognostiziert, dass sich ZIKV genauso wie DENV auf alle Gebiete ausbreiten wird, in denen Aedes Mücken endemisch sind (MALONE et al., 2016).

1.11. Therapie und Gegenmaßnahmen

Es stellt eine schwierige Herausforderung dar, die ZIKV-Ausbreitung effektiv einzudämmen. Essentiell ist die Entwicklung verlässlicher Diagnostika, Virostatika und Impfstoffe sowie ein besseres Verständnis der Pathogenese und der Epidemiologie, um der Krankheit entgegenzutreten (MALONE et al., 2016). Bislang gibt es für ZIKV weder zugelassene Impfstoffe noch spezifische Therapiemethoden oder antivirale

Medikamente. Daher besteht weiterhin ein dringender Bedarf an neuen Lösungs- und Therapieansätzen (MUSSO und GUBLER, 2016).

Die prinzipiellen Maßnahmen gegen die Erkrankung sind dieselben, die bei allen von Stechmücken übertragenen Krankheiten angewendet werden, für die es noch keine effizienten Impfstoffe gibt: Da der Hauptübertragungsvektor die Aedes-Mücke ist, ist die Vektorkontrolle und der Schutz vor Mückenstichen von vorrangiger Bedeutung (z.B.: Fliegengitter an Fenstern, langärmlige Kleidung, Insekten-Repellents, etc.) (TEIXEIRA et al., 2016).

Mehrere Präparate haben *in-vitro* bereits Wirkung gegen ZIKV gezeigt, aber noch keines davon wurde bisher in klinischen Studien getestet (MUSSO und GUBLER, 2016). Da somit noch keine Therapiemittel gegen ZIKV behördlich zugelassen wurden, wird daher empfohlen, die Krankheit symptomatisch zu behandeln (beispielsweise Paracetamol gegen Fieber und Schmerzen sowie Antihistaminika gegen die juckenden Hautausschläge). Es wird außerdem empfohlen den virämischen Patienten während der ersten Tage insoweit zu isolieren, dass Mückenstiche vermieden und dadurch Infektionen Anderer verhindert werden können (MUSSO und GUBLER, 2016).

Therapiemöglichkeiten für das ZIKV-assoziierte GBS sind die gleichen wie beim klassischen GBS und beinhalten die Verwendung von therapeutischem Plasma oder die intravenöse Gabe von Antikörpern (ORGANIZATION, 2016b).

Der weitere Umgang mit betroffenen Säuglingen ist abhängig von bildgebender Diagnostik und Klinik (ADEBANJO et al., 2017). Angesichts des Risikos für Entwicklungsverzögerungen wird die Hilfe von Experten benötigt, die mögliche Komplikationen überwachen und frühzeitige Gegenmaßnahmen einleiten können (MUSSO und GUBLER, 2016). Darüber hinaus ist im Umgang mit durch-ZIKV-beeinträchtigten Kindern die enge Betreuung durch die Familie ein wichtiges Schlüsselement (ADEBANJO et al., 2017).

Um sexuelle Übertragung und das CZS nach Verdacht auf bestehende Infektion vorzubeugen, wird empfohlen für zwei Monate, wenn der Partner mit Verdacht auf Infektion weiblich ist, und für 3 Monate, wenn der Partner mit Verdacht auf Infektion männlich ist, den Geschlechtsverkehr nur

geschützt durchzuführen oder ihn bei Kinderwunsch gänzlich auf die Zeit nach der Infektion zu verschieben (ORGANIZATION, 2016c; POLEN et al., 2018).

In der Vergangenheit wurde erfolgreich eine Vielzahl von Ansätzen angewendet, um effektive Impfstoffe gegen diverse Flaviviren herzustellen. Es liegt dabei nahe, diese gewonnenen Erkenntnisse dementsprechend auch auf die ZIKV-Impfstoffentwicklung anzuwenden.

Bisher sind mehr als 10 ZIKV-Impfstoffkandidaten in Phase 1 und einer in Phase 2 der klinischen Studien fortgeschritten (MUSSO und GUBLER, 2016). Dass die Inzidenz von ZIKV-Infektionen nach der Pandemie erfreulicherweise stark abgenommen hat, wirft bei der Beurteilung ihrer Wirksamkeit mittlerweile ein großes Hindernis auf, da die Umsetzung von Phase 2 und 3 der klinischen Studien dadurch stark eingeschränkt wird (VANNICE et al., 2019).

Um weiterhin Wirksamkeitsdaten für die Zulassung eines Impfstoffs zu erhalten, werden mitunter alternative Ansätze, wie beispielsweise kontrollierte menschliche Belastungsinfektionen in Betracht gezogen (VANNICE et al., 2019).

Eine der größten Herausforderungen bei der Entwicklung von Gegenmitteln besteht darin, dass diese hauptsächlich bei schwangeren Frauen angewendet werden sollen. Tests an schwangeren Frauen sind deswegen ein essentieller Bestandteil für die Entwicklung neuer ZIKV-Therapie. Medikamente an Schwangeren zu testen, stellt sich allerdings als nicht unproblematisch dar. Durch die Zurückhaltung bei derartigen Studien kommt es in Bereichen der Arzneimittelsicherheit kaum zu neuen Erkenntnissen, was eine große Hürde für die Ermöglichung einer angemessenen Schwangerschaftsvorsorge darstellt (MUSSO und GUBLER, 2016).

1.12. Plazentaschranke als Hindernis für Zika

Von besonderem Interesse und Bedeutung sind diejenigen Mechanismen, die es ZIKV ermöglichen, die Plazentaschranke zu überwinden und im Zuge dessen die sich entwickelnden Feten zu schädigen. Defekte der Plazenta, wenn auch nur kleine, können in jedem Stadium der Schwangerschaft zu

Fehlgeburten und anderen unerwünschten Wirkungen führen (COYNE und LAZEAR, 2016).

Die Plazenta des Menschen wird als hämochorial bezeichnet, was bedeutet, dass direkter Kontakt zwischen maternalem Blut und den villösen, fetalen Chorionzotten der Plazenta besteht. Diese baumartigen Zottenoberflächen werden aus sogenannten Synzytiotrophoblasten (SYNs) gebildet (ROSSANT und CROSS, 2001). Aufgrund ihres direkten Kontakts mit maternalem Blut spielt die SYN-Schicht eine entscheidende Rolle beim Schutz des Fetus vor schädlichen Einflüssen wie verschiedenen Krankheitserregern. Trotz dieser robusten Barriere haben Pathogene diverse Wege gefunden, sie zu umgehen oder sie zu durchbrechen. Diese Wege variieren je nach Gestationsstadium (COYNE und LAZEAR, 2016). Nach circa 12 Wochen, was ungefähr dem Ende des ersten Trimesters entspricht, ist die Entwicklung des uteroplazentären Kreislaufsystems vollständig abgeschlossen. Ab diesem Moment ist die Plazenta das einzige Hindernis, das Mikroorganismen aus dem maternalen Blut den Zugang zum Fetus verwehrt. Mitunter aufgrund dieser Tatsache ist es sehr wahrscheinlich, dass sich die Mechanismen der vertikalen Übertragung zwischen den frühen und späteren Stadien (>12 Wochen) der Schwangerschaft weitreichend unterscheiden (COYNE und LAZEAR, 2016).

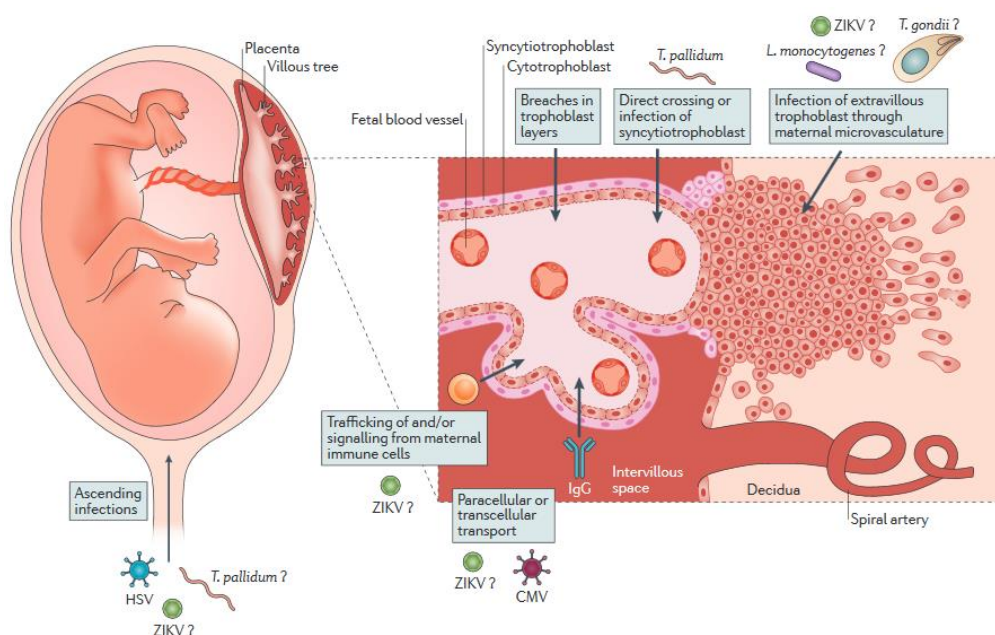


Abbildung 7: **Mögliche Infektionsrouten um die Plazentaschranke zu umgehen**
(Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der Springer Nature Customer Service Center)

GmbH, *Journal*: Nature Reviews Microbiology, *Titel*: Zika virus — reigniting the TORCH, *Autor*: Carolyn B. Coyne et al, © 2016)

Die vertikale Übertragung von Pathogenen kann auf verschiedensten Wegen erfolgen. Das ZIKV könnte einerseits durch Transmigration infizierter maternaler Immunzellen in den Zottenkern bzw. den Fetus gelangen, vergleichbar mit der Transzytose fetaler Zellen in den maternalen Kreislauf (ADAMS und NELSON, 2004).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass es infolge der maternalen Immunantwort zur Beschädigung der Zotten und so zu Brüchen in der SYN-Schicht kommt, wodurch eine Viruspassage zu den tieferen und empfänglicheren Zellen wie den extravillösen Trophoblasten (EVTs) des Zottenkerns ermöglicht wird (COYNE und LAZEAR, 2016).

Theoretisch ist auch eine direkte Infektion der SYN-Schicht vorstellbar. Obwohl SYNs, die aus reiferen Plazenten isoliert wurden, aufgrund ihrer breiten antiviralen Resistenz nicht für die ZIKV-Infektion empfänglich waren (BAYER et al., 2016), ist es denkbar, dass es in sehr frühen Stadien der Schwangerschaft zu einer Infektion der unreiferen SYNs und anderen Plazentazellentypen kommt (TABATA et al., 2016). Es scheint somit wahrscheinlich, dass die Viren zumindest in späteren Schwangerschaftsstadien die Fähigkeit haben, auf anderen Wegen zum Fetus gelangen (COYNE und LAZEAR, 2016).

Eine weitere Möglichkeit neben der transplazentären hämatogenen Übertragung wäre eine transvaginal ascendierende Infektion des Fetus (DUDLEY et al., 2016).

2. Tiermodelle für die Zika-Infektion

Als Reaktion auf die ZIKV-Pandemie und den Ausbruch kongenitaler Anomalien hat die WHO im Februar 2016 den globalen Gesundheitsnotstand ausgerufen. Diese von ZIKV ausgehende Bedrohung hat zur Etablierung einer Reihe von *in-vivo* Modellen geführt, um Übertragung und Pathogenese, unter anderem auch während der Schwangerschaft, besser untersuchen und verstehen zu können. Dadurch war eine wichtige Grundlage geschaffen, um neue wichtige Einblicke in die

ZIKV-Biologie zu erhalten. Indem Forscher nun die Möglichkeit hatten, den Infektionsweg und auch das Gestationsalter festzulegen, war es ihnen möglich, die Teratogenität der Infektion zu bestätigen und außerdem die Faktoren vertikaler Übertragung und der Neuropathogenese zu untersuchen.

2.1. Mausmodelle

Als die am häufigsten verwendeten Versuchstiere standen Mäuse an erster Stelle, um als Tiermodell für die ZIKV-Infektion etabliert zu werden. Die relativ geringen Kosten, die kurzen und ergiebigen Reproduktionszyklen und die einfache Handhabung begünstigen ihren weitverbreiteten Gebrauch. Mit ihnen können viele wichtige Gesichtspunkte menschlicher Erkrankungen nachempfunden werden (TAKAKI et al., 2017). Bevor Impfstoffe oder Therapeutika am Menschen getestet werden können, müssen sich diese Stoffe zunächst in Mäusen beweisen und dort die gewünschte und sichere Wirkung zeigen.

Mithilfe neuer Technologien (CRISPR-Cas9-Mutationen, Deletionen, etc.) hat man darüber hinaus die Möglichkeit, die Genetik von Mäusen so zu verändern, dass die Wirkung oder auch die Abwesenheit bestimmter Gene auf die Infektion und die Immunität erforscht werden kann (CAINE et al., 2018).

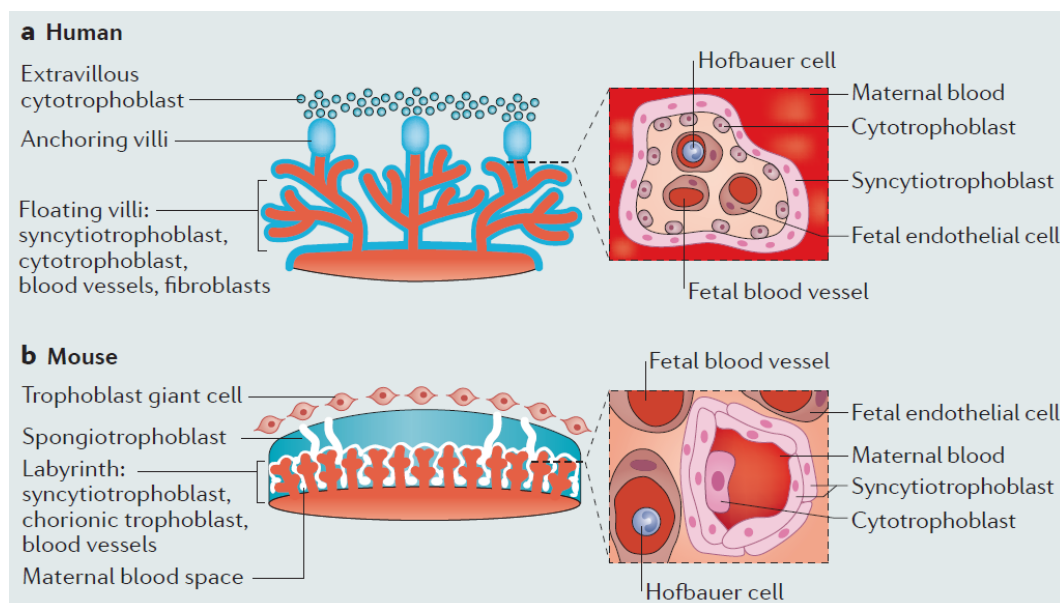


Abbildung 8: **Vergleichende Strukturdarstellung humaner und muriner Placenten;**
(Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der Springer Nature Customer Service Center

GmbH, *Journal*: Nature Reviews Microbiology, *Titel*: Zika virus — reigniting the TORCH, *Autor*: Carolyn B. Coyne et al, © 2016)

Es gibt bei der Verwendung von Mausmodellen sowohl Vor- als auch Nachteile, um infektionsbedingte Wirkungen auf die Schwangerschaft näher zu untersuchen. Zum einen ist die Tragzeit von Mäusen mit nur circa 20 Tagen um einiges kürzer als die des Menschen (circa 9 Monate). Zum anderen gibt es gewisse Strukturunterschiede zwischen der Maus- und der Humanplazenta, obwohl beide in direktem Kontakt zu maternalem Blut stehen (COYNE und LAZEAR, 2016). Die Mausplazenta besitzt drei übereinanderliegende Trophoblastenschichten (hämotrichorial) im Vergleich zur humanen Plazenta mit nur einer Schicht (hämomonochorial). Neben dieser anatomischen Variation gibt es daneben noch weitere immunologische Unterschiede (CAINE et al., 2018). Insgesamt ist festzustellen, dass gewonnene Erkenntnisse aus Schwangerschaftsstudien an Mäusen nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen werden können (KIM und SHRESTA, 2016).

Da Wildtyp-Mäuse gegen die ZIKV-Infektion relativ unempfindlich sind, werden für die ZIKV-Forschung vor allem immundefiziente Mauslinien herangezogen (CAINE et al., 2018). Diese stark beeinträchtigten antiviralen Reaktionen ermöglichen dadurch eine produktive ZIKV-Infektion (LAZEAR et al., 2016). Um die fetale Infektion zu untersuchen wird in anderen Ansätzen die direkte intrauterine Infektion benutzt (LI et al., 2016a). Diese Methode spiegelt allerdings in keiner Weise die gesehene transplazentäre Übertragung der virämischen Mutter wider.

Als die Mikrozephalie-Fälle während des ZIKV-Ausbruchs zunahmen, konnte man durch die schnelle Verfügbarkeit von Mausschwangerschafts-Modellen die vermutete Kausalität zwischen ZIKV und fetalen Anomalien nachweisen (MINER et al., 2016b).

2.1.1. Immunkompetentes Mausmodell

In immunkompetenten Mauslinien wie C57BL/6 oder BALB/c führte die periphere, subkutane ZIKV-Belastungsinfektion weder zu klinischen Symptomen, noch zu Gewichtsverlust oder Mortalität und es kam kaum zu

Virusreplikation (LAZEAR et al., 2016; CAINE et al., 2018). Der Grund hierfür ist, dass ZIKV das murine STAT2 von Wildtyp- (WT-) Mäusen nicht antagonisieren kann, wohingegen es das humane STAT2 ausschalten kann. STAT2 stellt einen wichtigen Schlüsselfaktor des IFN-Signalwegs dar. Das angeborene Immunsystem der WT-Mäuse kann dadurch die ZIKV-Infektion relativ schnell beseitigen (GRANT et al., 2016). Es kam in diesen WT-Mausmodellen nur auf unphysiologischen Infektionsrouten zu fetalen Anomalien (intrauterin, intravenös, direkte Injektion ins Fruchtwasser) (CAINE et al., 2018; SHI et al., 2018).

Um mit einer trotzdem vergleichsweise immunkompetenten Maus ein relativ physiologisches Infektionsmodell mit subkutanem Infektionsweg (ähnlich eines Mückenstichs) zu erstellen, wurde das Maus-STAT2-Gen durch das humane STAT2-Gen (hSTAT2-KI-Mäuse) ersetzt (GORMAN et al., 2018). Diese Substitution ermöglichte es dem Virus das humane STAT2 und somit einen Teil des angeborenen Immunsystems der Mäuse zu umgehen. Bei Verwendung einer Kombination aus einem an die Maus adaptierten ZIKV-Dakar-Stammes und der hSTAT2-KI Mäuse konnte man virale RNA in Plazenten und fetalen Köpfen nachweisen und somit ein immunokompetentes Modell nach physiologischer s.c. Infektion erstellen (GORMAN et al., 2018).

2.1.2. Typ-I-Interferon-Rezeptor-defizientes (IFNAR^{-/-}) Mausmodell

Wie oben erwähnt werden in der ZIKV-Forschung neben diesen immunkompetenten Modellen hauptsächlich Mauslinien mit manipuliertem Immunsystem verwendet. Unter physiologischen Umständen erkennt das angeborene Immunsystem normalerweise die Infektion (MEDZHITOV, 2001) und aktiviert verschiedene Signalkaskaden, die zur Ausschüttung von Zytokinen und zur Produktion von Typ-I-IFN führen (HONDA und TANIGUCHI, 2006). Die Bindung des Typ-I-IFNs an den IFNAR-I-Rezeptor führt schließlich dazu, dass eine Gruppe sogenannter ISGs (Gene, die durch Interferone stimuliert werden) die Hemmung der Virusreplikation initiieren und die primäre adaptive Immunantwort aktivieren, um das Virus zu beseitigen (SCHOGGINS und RICE, 2011; CAINE et al., 2018).

Um diese angeborene Immunantwort zu umgehen und somit eine produktive ZIKV-Infektion zu ermöglichen, entwickelten Lazear et al. ein Mausmodell mit einem Knock-Out des Interferon- (IFN-) Rezeptors vom Typ I (IFNAR^{-/-}) (LAZEAR et al., 2016). Diese Mäuse besitzen somit eine defiziente Interferon-Signalgebung.

Eine ähnliche Herangehensweise war die Verabreichung eines Anti-IFNAR-I-Antikörpers (MAR1-5A3). Die entstehende Klinik dieser beiden ähnlichen Infektionsmodelle stand weitestgehend mit der des Menschen im Einklang und es kam zu neurologischen Erscheinungen mit hoher Viruslast in ZNS, Rückenmark, Serum und Gonaden (MINER et al., 2016b; CAINE et al., 2018).

Wenn weibliche IFNAR^{-/-} Mäuse mit WT-Männchen verpaart werden, entstehen für die IFN-Signalgebung heterozygote Feten. Nachdem so verpaarte Mütter am Trächtigkeitstag (embryonic day, ED) 6,5 oder 7,5 subkutan mit ZIKV infiziert wurden, verstarben die meisten mischerbigen Feten und hinterließen dabei nur einen plazentären Rest. ZIKV-Antigen wurde histologisch in Endothelzellen und verschiedenen Trophoblasten nachgewiesen (MINER et al., 2016b; CAINE et al., 2018), was Ergebnissen von humanen *in-vitro* Trophoblasten-Studien entspricht (BAYER et al., 2016).

Weitere Resultate der Infektion waren Apoptose und schwere Verletzungen der plazentären Gefäßversorgung, was folglich wahrscheinlich zur Plazentainsuffizienz führte. Diese Befunde lassen vermuten, dass die geschädigte Blut-Plazenta Schranke von ZIKV überwunden werden kann (CAINE et al., 2018).

Des Weiteren konnte man an Tag 16.5 der embryonalen Entwicklung (ED 16.5) virale RNA in fetalen Köpfen nachweisen. Dieser Zeitpunkt repräsentiert eine entscheidende Phase in der Entwicklung des fetalen Gehirns (MINER et al., 2016b).

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass in diesen Mausmodellen neben ZIKV auch noch andere Flaviviren fetale Schädigungen hervorrufen können, wurden mit MAR1-5A3 vorbehandelte Mäuse mit DENV infiziert. Dabei wurden allerdings keine Anzeichen plazentärer Läsionen oder Beeinträchtigungen des Fetus entdeckt (SARATHY et al., 2015). Diese

Befunde lassen vermuten, dass der Tropismus für Plazentazellen für das ZIKV spezifisch ist (CAINE et al., 2018).

2.1.3. Auswirkungen des Gestationsstadiums im Tiermodell

Es gibt viele Hinweise darauf, dass der Schweregrad spezifischer ZIKV-bedingter fetaler Missbildungen vom Gestationsalter abhängig ist, in dem die Infektion der schwangeren Frau stattfindet (LIN et al., 2017). Feten von Müttern, die in den ersten beiden Trimestern infiziert wurden, waren einem höheren Risiko ausgesetzt, CZS zu entwickeln, verglichen mit maternalen Infektionen im dritten Trimester (POMAR et al., 2017).

In diesem Zusammenhang untersuchten Paploski et al. die zeitliche Korrelation zwischen ZIKV-bedingten Hautausschlägen und auftretenden Mikrozephalie- und GBS-Fällen. Die Anzahl der GBS-Fälle erreichte 5 bis 9 Wochen nach Auftreten des Hautausschlags ihren Höhepunkt, während das Maximum der Mikrozephalie-Fälle erst nach 30 bis 33 Wochen beobachtet wurde (PAPLOSKI et al., 2016). Dies entspricht einer möglichen Infektionszeit während des ersten Trimesters, was die für den Fetus wohl empfindlichste Schwangerschaftsperiode darstellt (JOHANSSON et al., 2016).

In einer anderen Studie kam es zu keinen sichtbaren Beeinträchtigungen für den Fetus von Frauen, welche sich während des dritten Trimesters mit ZIKV infiziert hatten (PACHECO et al., 2016). Im Gegensatz dazu wurde in anderen Veröffentlichungen jedoch bei weit späteren erfolgten Infektionen fetale Beeinträchtigungen festgestellt, einschließlich Plazentainsuffizienz, intrauteriner Wachstumseinschränkung, zerebraler Verkalkung, Mikrozephalie sowie fetalem Tod (BRASIL et al., 2016; FRANCA et al., 2016). Das deutet darauf hin, dass ZIKV nicht nur im ersten Trimester, sondern in verschiedensten Schwangerschaftsstadien verheerende Folgen für den Fetus zur Folge haben könnte.

Infizierte schwangere WT-Mäuse hatten übereinstimmend mit diesen Daten eine größere Anzahl resorbierter Feten, wenn die Infektion an ED 9.5 im Vergleich zu ED 12.5 stattfand (SZABA et al., 2018). Ebenso zeigten heterozygote WTxIFNAR^{-/-} Feten geringeren Kopfumfang und kürzere Scheitel-Steiß-Länge, wenn sie an ED 9.5 im Vergleich zu ED 12.5 infiziert

wurden (JAGGER et al., 2017). Zudem waren Viruslast und fetaler Tod nach Infektion an ED 6.5 am höchsten im Vergleich zu Infektionen an ED 9.5 und ED 12.5 (CAINE et al., 2018).

Es ist also zusammenfassend festzustellen, dass die rasche Entwicklung diverser Mausmodelle eine vielversprechende Plattform bot, um die Kausalität zwischen erfolgter ZIKV-Infektion und fetaler Anomalien zu bestätigen. Mausmodelle wurden erfolgreich dafür eingesetzt, viele Aspekte der ZIKV-Infektion, einschließlich des teratogenen Potenzials während der Schwangerschaft, zu rekapitulieren. Die Modelle bieten auch noch weiterhin eine sehr gute Möglichkeit für die effektive Testung von Gegenmaßnahmen gegen ZIKV (CAINE et al., 2018).

2.2. Nicht-menschliches Primatenmodell

Auch bei nicht-menschlichen Primaten (NHPs) wie den Rhesusaffen können viele Aspekte der menschlichen ZIKV-Krankheit beobachtet werden (CAINE et al., 2018). Vor allem in Bezug auf ZIKV-Infektionen während der Schwangerschaft besitzen NHPs eine größere Ähnlichkeit mit dem Menschen als die Mäuse. NHPs haben im Vergleich zu den Mäusen längere Tragzeiten (GRIGSBY, 2016), wie beispielsweise 146-186 Tage bei Makaken, was der menschlichen Schwangerschaft eher nahek kommt als die relativ kurze Gestationszeit von nur circa 20 Tagen bei Mäusen. Des Weiteren ähnelt die Architektur der menschlichen Plazenta sehr der Makaken-Plazenta (SLAYDEN, 2014) und eignet sich daher als scheinbar naheliegenderes Modell, um kongenitale Folgen und Anomalien der Zika-Infektion zu erforschen (STOUFFER und WOODRUFF, 2017). Man erhofft sich dadurch, neue und bedeutsame Einblicke in die Mechanismen der transplazentären Infektion und der Pathogenese im Fetus zu bekommen (DUDLEY et al., 2016; CAINE et al., 2018).

Übereinstimmend mit dem milden humanen Phänotyp, erschien der Großteil der ZIKV-infizierten Makaken gesund oder zeigte nur geringgradige Symptome (HABY et al., 2018). Normalerweise verursacht ZIKV eine akute Infektion mit einer innerhalb einer Woche beendeten Virämie. Im Blut schwangerer NHPs jedoch beobachtete man eine Persistenz der ZIKV-RNA bis 70 Tage nach der Infektion mit einer

maximalen Virämie während der ersten Woche, was mit Berichten aus humanen Schwangerschaften übereinstimmt (DRIGGERS et al., 2016). Weitere Studien zeigten, dass schwangere NHPs, die im ersten Trimester infiziert wurden, weitaus länger (28 bis 70 Tage) virämisch waren als diejenigen, die während des zweiten Trimester infiziert wurden (14-42 Tage) (MARTINOT et al., 2018). Diese Beobachtungen waren interessant, da dagegen bei nicht-schwangeren NHPs, ähnlich wie beim Menschen, eine nach einer Woche verebbende Virämie beobachtet wurde (NGUYEN et al., 2017). Man nimmt an, dass diese persistierende maternale Virämie auf die immerwährende Abgabe von Viren in den maternalen Kreislauf durch die infizierte Plazenta bzw. den infizierten Fetus zurückzuführen ist. Das bedeutet, dass somit ein Virus-Reservoir besteht, das durch das Immunsystem nicht erfolgreich beseitigt werden kann (CAINE et al., 2018). Eine andere Erklärung für die persistierende Virämie könnte das Herunterfahren des maternalen Immunsystems während der Schwangerschaft sein, mit der daraus resultierenden Unfähigkeit, die ZIKV-Infektion gänzlich zu beseitigen (CAINE et al., 2018).

2.2.1. Kongenitales Zika Syndrom in Nicht-menschlichen Primaten

Es wurde in den ersten NHP-Modellen auch von erfolgter vertikaler Übertragung berichtet, obwohl fetale Beeinträchtigungen wie Schädel- und Gehirnanomalien dabei nicht gesehen wurden (CAINE et al., 2018). Zehn Tage nach der ZIKV-Inokulation zeigten MRT-Untersuchungen periventrikuläre Läsionen in den okzipital-parietalen Lappen des fetalen Gehirns (ADAMS WALDORF et al., 2016). In gegenwärtigeren Studien wurden brasilianische, epidemische ZIKV-Stämme benutzt, welche zu höherer fetaler Sterblichkeit führten (MAGNANI et al., 2018).

In weiteren Studien wurde die Hypothese bekräftigt, dass, je früher die ZIKV-Exposition während der Schwangerschaft stattfindet, desto ernstere Folgen gibt es für den Fetus. Bei Infektionen im ersten Trimester (<7 Wochen) wurde fetales Absterben häufiger beobachtet als bei Infektionen im zweiten (>ED 55) und dritten Trimester (MAGNANI et al., 2018). Bei überlebenden Feten fand man Hinweise auf Mikroverkalkungen, neuronale Nekrose, Blutungen und Augendefekte, es kam aber zu keiner auffallenden

Mikrozephalie (MARTINOT et al., 2018). Ein Hauptziel der Infektion neben dem Fetus war die Plazenta. Außerdem deckte die Histologie eine Entzündung der Dezidua und eine Chorioamnionitis auf (CAINE et al., 2018; HIRSCH et al., 2018).

In Zukunft wird es aufgrund verringerter Fallzahlen in endemischen ZIKV-Regionen schwierig werden, Wirksamkeitsstudien am Menschen für Impfstoffe und Therapeutika durchzuführen. Viele Aspekte der menschlichen ZIKV-Pathologie während der Schwangerschaft werden im NHP-Modell widerspiegelt (CAINE et al., 2018). Die Tatsache, dass ein bei Mäusen wirksam-getesteter Impfstoff gegen ZIKV-Infektion während der Schwangerschaft bei Rhesusmakaken keinerlei Protektion zeigte, beweist, welche wichtige Rolle NHP-Impfstoffstudien bei der Evaluierung von Gegenmaßnahmen vor finalen klinischen Studien spielen (SHAN et al., 2017; CAINE et al., 2018).

2.3. Ultrasonographische Pränataldiagnostik

Die CDC empfiehlt bei Verdacht auf eine bestehende ZIKV-Infektion schwangerer Frauen wiederholte Ultraschalluntersuchungen des Fetus, um mögliche ZIKV-bedingte Missbildungen wie Hypoplasie des Kleinhirns, Ventrikulomegalie im Großhirn oder Mikrozephalie frühzeitig erkennen zu können (CAO et al., 2017; ADAMS WALDORF et al., 2018).

Das Prinzip der Sichtbarmachung von Strukturen mittels Schallwellen wird seit Erfindung des Echolots zur Ortung von Unterseebooten verwendet und findet heute in der präzisen Darstellung feinsten anatomischer Strukturen in der Medizin seine Anwendung. Die moderne Ultraschallsonde erzeugt Schallwellen mit einer Frequenz von 1-40 MHz. Durch die Impedanz des Gewebes werden verschiedenartige Echos zurückgeworfen und daraufhin weiter prozessiert. Dieses so erhaltene Signal wird dann in verschiedenen Grautönen auf dem Bildschirm in zweidimensionaler Darstellung wiedergegeben. Dadurch ist es möglich, mithilfe dieser bildgebenden Diagnostik auf nicht-invasivem Weg eine repräsentative Momentaufnahme der Vorgänge innerhalb eines lebendigen Körpers zu erhalten.

Ein sehr bekanntes und wichtiges Gebiet der Ultraschalluntersuchung stellt

die pränatale Untersuchung schwangerer Frauen dar. Sowohl bei routinemäßigen Schwangerschaftschecks als auch bei begründeter Indikation, wie beispielsweise bei abnormalen Schwangerschaftsverläufen oder aber in Anbetracht einer bestehenden kongenitalen Infektion, erweist sich die bildliche Darstellung als elementares Hilfsmittel, die Vitalität und den Entwicklungsfortschritt des Fetus näher zu beurteilen.

In der Forschung wird die Trächtigkeitssonographie vor allem bei NHP-Modellen der ZIKV-Infektion angewendet. In etablierten Mausmodellen wird sie jedoch aufgrund der relativ kurzen Gestationszeit und der geringen Tiergröße sehr selten eingesetzt. Dies könnte sich im weiteren Verlauf jedoch auch im Mausmodell als geeignetes Hilfsmittel für das bessere Verständnis der Entstehung kongenitaler Missbildungen herausstellen.

Um die kongenitale Pathogenese unmittelbar beurteilen zu können, sollte die Ultraschalluntersuchung der trächtigen Maus im Zuge dieser Arbeit als neue diagnostische Möglichkeit etabliert werden, um unter anderem eine Grundlage für zukünftige Studien zu schaffen, die potenzielle Schutzwirkung ausgewählter Gegenmittel besser evaluieren zu können.

III. ZIELSETZUNGEN

In Bezug auf die ZIKV-Epidemie 2015/16 in Südamerika und das Fehlen zugelassener Impfstoffe oder Therapien werden in dieser Arbeit die folgenden Punkte beschrieben:

- (i) Die Etablierung einer fetalen Ultraschalluntersuchungs-Methode als neuer diagnostischer Ansatz, um die Pathogenese von ZIKV in einem frühen Stadium der Mäuseschwangerschaft besser zu verstehen
- (ii) Untersuchung der Folgen einer ZIKV-Infektion bei trächtigen IFNAR -/- Mäusen mittels Ultraschall
 - Nachweis von ZIKV-induzierten Missbildungen und Schädigungen von Feten
 - Kontrolle auf pathologische Veränderungen der Plazenta
- (iii) Ausblick auf möglichen Einsatz dieser Untersuchungsmethode, um Impfstoffkandidaten und Therapeutika zur Verhinderung der Übertragung von Zika auf den Fetus zu testen

IV. ERGEBNISSE

Das Manuskript wird in zur Veröffentlichung angenommener Form vorgelegt (FORSTER et al., 2020).

Obstetric ultrasonography to Detect Fetal Abnormalities in a Mouse Model for Zika Virus Infection

Dominik Forster ¹, Jan Hendrik Schwarz ¹, Katrin Brosinski ¹, Ulrich Kalinke ², Gerd Sutter ^{1,3} and Asisa Volz ^{1,3}

¹Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig-Maximilians-University Munich, 80539 Munich, Germany

²Institute for Experimental Infection Research, TWINCORE, Centre for Experimental and Clinical Infection Research, a joint venture between the Helmholtz Centre for Infection Research Braunschweig and the Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany

³German Center for Infection Research (DZIF), partner site Munich, 80539 Munich, Germany

In 2015 Zika virus (ZIKV) emerged for the first time in South America. The following ZIKV epidemic resulted in the appearance of a clinical phenotype with microcephaly and other severe malformations in newborns. So far, mechanisms of ZIKV induced damage to the fetus are not completely understood. Previous data suggest that ZIKV may bypass the placenta to reach the fetus. Thus, animal models for ZIKV infection are important to facilitate studies about ZIKV infection during pregnancy. Here, we used ultrasound-based imaging (USI) to characterize ZIKV induced pathogenesis in the pregnant Type I interferon receptor-deficient (IFNAR^{-/-}) mouse model. Based on USI we suggest the placenta to be a primary target organ of ZIKV infection enabling ZIKV spreading to the fetus. Moreover, in addition to direct infection of the fetus, the placental ZIKV infection may cause an indirect damage to the fetus through reduced uteroplacental perfusion leading to intrauterine growth retardation (IUGR) and fetal complications as early as embryonic day (ED) 12.5. Our data confirmed the capability of USI to characterize ZIKV induced modifications in mouse fetuses. Data from further studies using USI to monitor ZIKV infections will contribute to a better understanding of ZIKV infection in pregnant IFNAR^{-/-} mice.

Introduction

ZIKV has been first identified in 1947 in a sentinel monkey in ZIKV forest in Africa. First confirmation of ZIKV in humans has been obtained in 1952, when ZIKV was firstly isolated from a human suffering from the so called Zika Fever (DICK et al., 1952). Since then, sporadic ZIKV outbreaks have occurred in Africa and Asia (FAYE et al., 2014). Another clinical outcome of ZIKV infection is the induction of the Guillain-Barré syndrome manifesting in various neurological disorders through damaging the peripheral nervous system (IOOS et al., 2014; OEHLER et al., 2014; DO ROSARIO et al., 2016; SCHULER-FACCINI et al., 2016). As a classical arbovirus, ZIKV is transmitted by mosquitos (MARCHETTE et al., 1969; MUSSO et al., 2015c; IMPERATO, 2016). In addition, recent data confirmed that ZIKV can be also spread through the sexual and vertical route (COYNE und LAZEAR, 2016; D'ORTENZIO et al., 2016; LAZEAR und DIAMOND, 2016; MANSUY et al.,

2016). In 2015 the virus suddenly emerged on the American continent causing an epidemic of congenital human abnormalities. During the epidemic, ZIKV infection during pregnancy resulted in fetal abnormalities such as microcephaly, neurological malfunction, and spontaneous abortion (BRASIL et al., 2016; CAUCHEMEZ et al., 2016; COYNE und LAZEAR, 2016). Of note, a significantly increased occurrence of the congenital ZIKV syndrome (CZS) has been observed in South America in Brazil, Columbia and other countries, with diagnosis occurring in different geographical areas without epidemiological connectivity. Interestingly, in a cohort study performed early during the Brazilian ZIKV epidemic revealed that 42% of the fetuses developed CZS independent of the trimester of infection in a cohort of 182 ZIKV-infected and symptomatic pregnant women (BRASIL et al., 2016). In human fetal studies brain imaging findings have been undertaken using magnetic resonance imaging (MRI) and fetal ultrasound (ANONYMUS, 2016; MLAKAR et al., 2016; JOOB und WIWANITKIT, 2017). The major clinical findings during the pregnancy included ventriculomegaly in the cerebrum, hypoplasia of the cerebellum, calcifications and myelination defects resulting in different malformations (CAO et al., 2017; ADAMS WALDORF et al., 2018). Moreover, after birth CZS is characterized by significant damage of the sensorineurological outcomes including hearing loss and significant ocular defects (OLIVEIRA MELO et al., 2016; VENTURA et al., 2016a; MINER und DIAMOND, 2017; DE CARVALHO LEAL et al., 2019). However, we still know relatively little about the specific pathological mechanism underlying CZS (RUSSO et al., 2017). Preliminary insights into the molecular mechanism of ZIKV infection within fetuses came from studies using *in-vitro* cultures of different neuronal progenitor cells and brain cells (LI et al., 2016b). Here, ZIKV infection of progenitor cells of the cerebral cortex increased inflammation and cell death resulting in reduced cell proliferation. Moreover, ZIKV infection of astrocytes induced the modulation of the specific immune responses that suppresses the cell surface protein Axl (LUM et al., 2017; MEERTENS et al., 2017). Another mechanism of ZIKV induced fetopathogenesis as identified in an infection model of brain slices *in-vitro* generated from embryonic mice of various ages showed that ZIKV replication in the neocortical proliferative zone and in the developing midbrain induced apoptosis, which may limit viral dissemination

in the brain and may constrain virus-associated injury (ROSENFELD et al., 2017). In addition, the placenta is an important target organ of mother to fetus derived ZIKV infection. Here, *in-vitro* evaluation of placental cell organoids revealed that human trophoblast isolated early during pregnancy propagated ZIKV to very high titers (MINER et al., 2016b; HERMANN et al., 2018). In contrast, ZIKV infection of human trophoblast derived from later pregnancy stages demonstrated less efficient ZIKV amplification compared to the early pregnancy (SHERIDAN et al., 2017). This result may further support the hypothesis of reduced susceptibility of fetal ZIKV infection in later stages of pregnancy (BAYER et al., 2016). Currently, it is not understood how likely ZIKV infection during pregnancy results in infection and damage to the fetus. So far, the first trimester of human pregnancy is considered as the time period in which the fetuses are most vulnerable to ZIKV infection and the development CZS (EL COSTA et al., 2016; PETITT et al., 2017; GRAZEL und HARRIS-HAMAN, 2018). After confirmed or possible ZIKV infections in pregnant women, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recommends repeated fetal ultrasound to monitor for possible fetal malformation especially in the head regions. For humans, fetal ultrasound is well established and easy to interpret due to a wide range of technical features and support. However, with the progression of the American ZIKV epidemic, the incidence of ZIKV infection in pregnant women is also declining, before a detailed understanding of CZS has been accomplished. Therefore, animal models of ZIKV infection are important and essential to better understand the mechanisms and causes of CZS. Non-human primates have been established as a model for maternal ZIKV infection during pregnancy. In that context, Hirsch and coworkers already successfully used non-invasive ultrasound (US) throughout pregnancy to evaluate fetal growth, uteroplacental blood flow and amniotic fluid index (HIRSCH et al., 2018). The mice lacking the interferon alpha/beta receptor (IFNAR^{-/-}) provide a promising preclinical model of congenital ZIKV infection. Here, challenge infection on embryonic day 7.5 (ED 7.5) results in fetal abnormalities resembling the intrauterine growth restriction and spontaneous abortion observed in ZIKV-infected pregnant women. For this, the development of fetal ultrasound diagnostic tools might be advantageous to better

understand the pathogenesis of CZS in an early stage of mouse pregnancy. In addition, this approach would be helpful to test new therapies and vaccines that could prevent or mitigate the intrauterine ZIKV infection. Here, we characterized the outcome of ZIKV infection in pregnant IFNAR^{-/-} mice using USI. We confirmed the occurrence of ZIKV induced malformations and damage to fetuses on ED 13.5. Interestingly, modifications in the placenta, a major target organ of ZIKV infection, were not clearly visible by USI before ED 14.5. As the first sign of ZIKV induced pathogenesis we detected evidence of disturbed blood circulation in the uteroplacental vessels as early as ED 12.5 supporting the hypothesis of hypoxia induced damage to fetuses. These results support the future use of USI to better characterize ZIKV pathogenesis in pregnant IFNAR^{-/-} mice.

Materials and Methods

Study Design

Female 6-10-week-old IFNAR^{-/-} mice were mated in a 1:1 scheme for 24 h. Successful mating was observed by plug check on the following day. Plug positive mice were then separated and examined via ultrasound starting on embryonic day (ED) 4.5 which is the first timepoint for reliable confirmation of pregnancy. Signs of illness, weight loss, and survival were monitored daily. In two independent experiments mice ($n = 10$) were infected on ED 7.5 with a total dose of 10^3 plaque-forming-units (PFU) of Zika virus strain H/PF/2013 (EVAg, clinical isolate, French Polynesia 2013, GenBank Sequence Accession: KJ776791) diluted in 50 μ l physiological saline via footpad infection in the left hind leg. Control mice ($n = 8$) were mock-infected with saline (PBS).

On ED 16.5 mice were euthanized and fetuses ($n = 70$), placentas ($n = 70$) and selected maternal organs (brain, spinal cord, uterus, and ovaries) were harvested, weighed and documented. After fixation of samples with paraformaldehyde for histopathology, remaining organ material was stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for titration of infectious virus.

Mice

IFNAR^{-/-} mice (MULLER et al., 1994) backcrossed more than 20-fold on the C57BL/6 background were bred under specified-pathogen-free (SPF) conditions, housed in isolated cage units (IsoCage, Tecniplast, Hohenpeißenberg, Germany) and had access to food and water ad libitum. All experiments were approved by the Government of Upper Bavaria, Munich Germany and were performed in compliance with the German Animal Welfare Act.

Cells and Viruses

Vero (African green monkey kidney) cells (ATCC CCL-81) were used. Plaque-purified Zika virus (ZIKV) Isolate H/PF/2013 (EVAg, clinical isolate, French Polynesia 2013, GenBank Sequence Accession: KJ776791) was propagated on Vero cells. Viral titers were determined by plaque assay and titrated, with values reported in PFU as previously described (AGBULOS et al., 2016).

Ultrasound Imaging

For ultrasonographic examination we used the ultrasound system MyLab[™]Delta (Esaote, Genoa, Italy) with a linear array 20 MHz transducer (SL3116, Esaote, Genoa, Italy). We chose an ultrasound system that is routinely used in veterinary medicine for multiple approaches. Unanesthetized pregnant mice were exposed to B-Mode, 20MHz, pulsed USW and a scanning rate of 35 frames per second for 2-3 min in different schedules dependent on total duration and pregnancy time points (Figure 1). Approximately 1 cm³ prewarmed Aquasonic ultrasound gel (Parker, Fairfield, NJ 07004 USA) was placed between the transducer face and the abdomen of the mouse. Mice were scanned from caudal to cranial. In doing so, we positioned the bladder and the uterus including the specific position of the fetuses. We used the standard ultrasound examination to assess the morphology and size of the fetuses and the placenta. In addition, standard Doppler ultrasound measurements evaluating uteroplacental hemodynamics were performed by using the MyLab[™]Delta as described before (SEPULVEDA et al., 2003). Color Doppler ultrasound complements the ultrasonic B-mode examination and enables the assessment of

perfusion and circulation. Color Doppler ultrasound can be used to demonstrate the presence or the reduction of blood flow and its direction. Signals are reported and visualized via blue or red signals. Blood flow activity was measured by using the mean of the score of pulsation in brain vessel or umbilical cord diameter and the score of the percentage of living fetuses (see table below). Fetal heart rate was quantified by manually counting fetal heart contractions and so resulting Doppler USI signal.

Table 1: scoring sheet for characterization of blood flow activity in the umbilical cord and the fetal brain.

Pulsating umbilical cord diameter						
Score "a"	ED 11.5	ED 12.5	ED 13.5	ED 14.5	ED 15.5	ED 16.5
3	>0.5 mm	>0.5 mm	>0.6 mm	>0.6 mm	>0.7 mm	>0.8 mm
2	<0.5 mm	<0.5 mm	<0.6 mm	<0.6 mm	<0.7 mm	<0.8 mm
1	<0.3 mm	<0.3 mm	<0.4 mm	<0.4 mm	<0.5 mm	<0.5 mm
0	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

brain vessel diameter					
Score "b"	ED 12.5	ED 13.5	ED 14.5	ED 15.5	ED 16.5
3	>0.05 mm	>0.05 mm	>0.05 mm	>0.08 mm	>0.08 mm
2	<0.05 mm	<0.05 mm	<0.05 mm	<0.08 mm	<0.08 mm
1	<0.03 mm	<0.03 mm	<0.03 mm	<0.05 mm	<0.05 mm
0	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Score "c"	% living fetuses
3	>80%
2	<80%
1	<50%
0	<25%

Scoring:

umbilical cord blood flow activity = (Score "a" + Score "c") / 2

fetal brain blood flow activity = (Score "b" + Score "c") / 2

Determination of ZIKV Loads in Mouse Organs

Organs (brain, spinal cord, ovaries, uterus, placenta, embryonic head) were removed under aseptic conditions from sacrificed mice ($n = 8-10$). The organs were immediately frozen and subsequently thawed, weighed, and homogenized using 0.1 g of organ material with 1 ml PBS in a microtube

(Retsch Tissue Lyser MM300, Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Tubes were centrifuged for 1 min at 1.500 rpm and 4 °C. Supernatants were taken and stored at –80 °C. Viral titers in organ supernatants were determined by plaque assay as described before (AGBULOS et al., 2016) and indicated in PFU per 1 g organ material.

Histopathology and Immunohistochemistry

Placentas of sacrificed mice were routinely fixed in paraformaldehyde for 24 h and subsequently embedded in paraffin. Sections of 4 µm were stained with hematoxylin and eosin (HE) before being evaluated by light microscopy. Primary antibody for immunohistochemistry (IHC) was a rabbit anti-Flavi-E diluted (1:1000, absolute antibody, Ab00230-23.0, Oxford, UK). Placentas of PBS-inoculated mice served as negative controls. After deparaffinization, sections were blocked with hydrogen peroxide followed by diluted normal goat serum (30 min). Primary antibody incubation was done for 60 min at room temperature. Biotinylated secondary antibody was a goat-anti-rabbit antibody (1:200, Vector, BA-1000, Burlingame, CA, USA). Peroxidase-complexed avidin-biotin (ABC-HRP, Vector, PK-6100) and diaminobenzidine (DAB) were used for visualization and hemalaun as counterstain. Control experiments were performed by using chimeric rabbit IgG (abcam, AB172730, Cambridge, UK) as negative control and primary antibody on a mixed cell culture of ZIKV-infected and non-infected Vero cells. Von Kossa staining was used to detect and to quantify mineralization in placental samples. Images were taken by a Keyence microscope (Keyence BZ-X700, Keyence, Neu-Isenburg, Germany).

Statistical Analysis

All data were analyzed with GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego CA, USA) and MedCalc software (MedCalc Software, Ostend, Belgium). Data were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) and as medians and the interquartile range (IQR) of the median. Statistical analysis to compare two groups was performed using the Mann–Whitney test, the unpaired, two-tailed t-test after calculation of the area under the curve and the Shapiro–Wilk test for normal distribution. The threshold for statistical significance was $p < 0.05$.

Results

Outcome of ZIKV Infection in Pregnant IFNAR^{-/-} Mice as Analyzed by Sonography

To confirm pregnancy after positive plug-check, mice were examined on estimated ED 4.5 by USI. Here sectional views (Figure 1, A+B, ED 4.5) showed substantial proliferation of both uterus horns ("U") as seen in increased diameter relative to the bladder ("B", shown in black). This increase is accompanied by proliferation of the mucosa as seen by higher echogenicity (image brightness in USI) on the sectional plane of the uterus. These observations confirmed the successful implantation process and mice that met these anatomical criteria as visualized by USI were considered positive pregnant and were included in this study.

These mice were analyzed by USI every day and representative images are shown in Figure 1 for EDs 4.5, 9.5, 13.5, 14.5, and 16.5. On ED 7.5 pregnant mice were either infected with ZIKV or with PBS as mock control. Two days after the challenge infection (ED 9.5) we observed continued growth of ampoules in both uterus horns, as seen by an average diameter of 2.8 mm for the PBS mock-infected mice (Figure 1 A, ED 9.5, "U1/2", "B", the bladder in black, Figure 1C) and an average in diameter of 2.6 mm in the ZIKV-infected mice (Figure 1 B, ED 9.5, "U", transverse sections in relative position to the bladder "B", in black, Figure 1C). Of note, compared to the earlier embryonic stages as analyzed before, we succeeded in the imaging of two different sections through the uterus horn ampoules indicating an ongoing growth activity of physiological pregnancy for both experimental groups. These results indicate no obvious differences between PBS mock-infected mice and ZIKV-infected mice. On ED 13.5 USI identified a significant increase in the size of the uterus with a diameter of 7 mm in the mock-infected control group (Figure 1A, ED 13.5, Figure 1C). Of note bladder was not included in the picture using comparable insonation-angle (kept <20°) supporting this observation. In addition, we were able to visualize highly echogenic structures (in USI brighter shades of grey) within the less echogenic (in USI darker shades of grey) liquid filled lumens of the uterus indicating a developing fetus ("F" in Figure 1 A, ED 13.5).

A slightly brighter echogenic structure associated with the fetus suggested the starting formation of the first vessel structures. Under the tentative fetal structure another highly echogenic structure was visible that was identified as placental tissue ("P", framed by white crosses). In ZIKV-infected animals we observed different uterus sections with a mean diameter of 5.5 mm indicating reduced fetal and placental development compared to the mock-infected control mice on ED 13.5 (Figure 1B, ED 13.5, Figure 1C). In addition, hypoechogenic structures within the uterus lumen demonstrated the presence of free liquids. Free liquids, identified as highly echogenic structures were also clearly detectable within the uterus lumen representing embryonic residues. Of note, bladder ("B", black) still appeared in the USI while using the specific USI insonation-angle as established before. Another prevalent echogenic crescent-formed structure was visible on ED 13.5 in the ZIKV-infected mice showing the developing placental tissues (framed by white crosses).

On ED 14.5 USI in the PBS mock-infected group revealed the development of the ampoules with an average of 8 mm in diameter, corroborating the physiologic course of pregnancy (Figure 1C). This observation was further confirmed by transverse sections through the uterus horn lumens. Here, the specific echogenic structures strengthened the detection of a growing fetus ("F" in Figure 1A, ED 14.5), as identified by prominent anatomical structures, the fetal head ("FH") and fetal limbs. Moreover, on ED 14.5 the specific vessel structure, first seen on ED 13.5, showed further consolidation and was identified as the umbilical vein ("Uc"), connecting the fetus to the mother. In line with this observation, we could also detect the consolidation of the placental tissue ("P", framed by white crosses).

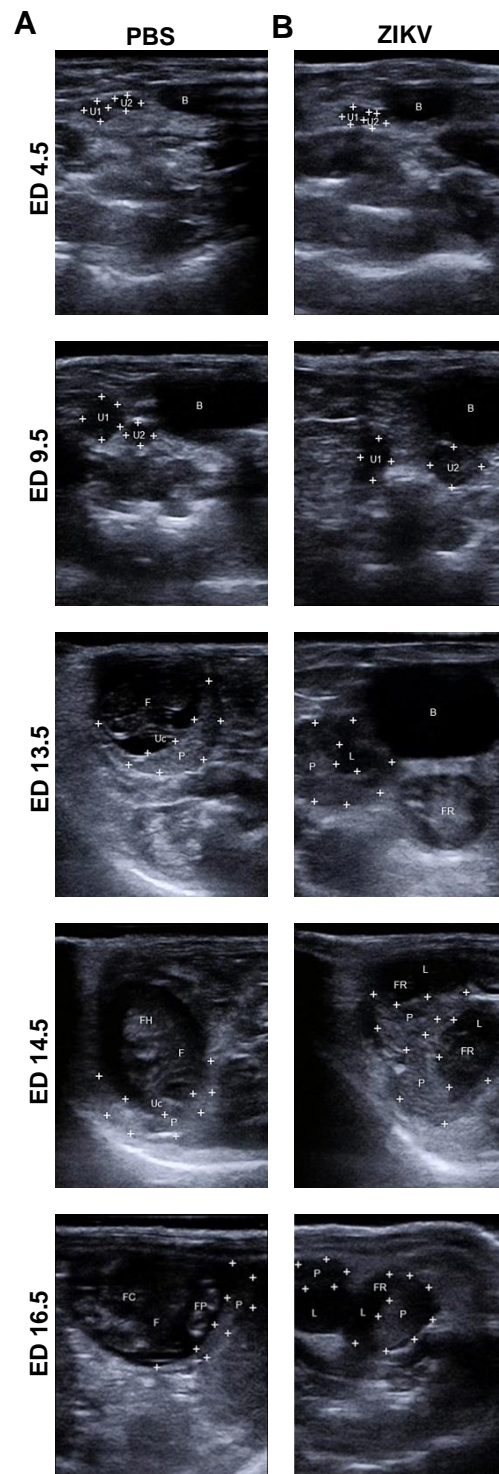
In contrast, in the ZIKV-infected group on ED 14.5, transverse sections through the uterus horn revealed a lumen-diameter of 6 mm in average, showing the same pattern as seen on ED 13.5 and 9.5 (Figure 1B, ED 14.5, Figure 1C). Of note, the size of the uterus ampoules as analyzed by USI, was smaller compared to the mock control group with 8mm in size (Figure 1C). When we performed USI through the ampoules an undefined bright echogenic structure was visualized, indicating resorbed fetal debris ("FR"). Further detailed screening through the uterine ampoules also indicated the presence of free liquid as visualized by less echogenicity. In the majority of

ampoules, no vessel-like structure was detectable by USI. While we did not detect many consolidated fetal structures in the ZIKV-infected mice, we were able to visualize the placental tissue adjacent to the resorbed fetal debris or in the liquid filled sections visible as hyperechogenic area ("P", framed by white crosses).

In the mock-infected group, after 16 days of gestation, on ED 16.5, uterus horns could be visualized as massive anatomical structures in the USI with a mean diameter of 9.5 mm (Figure 1A, ED 16.5, Figure 1C). Transversal sections analyzing the uterus ampoules revealed a further matured fetus ("F"), as identified by defined organic structures with the highly echogenic foci identified as the fetal heart ("FC") and the fetal paws as visualized with high echogenicity ("FP"). In addition, we could detect fully formed umbilical veins (Figure 1A, ED 16.5) connected to the associated crescent shaped placentas with bright echogenicity ("P", framed by white crosses) lining the uterus walls.

On ED 16.5 the uterus ampoules displayed a mean of 6mm in ZIKV-infected mice (Figure 1C). In addition, we detected comparable echogenic structures indicating resorbed fetal residues as seen in prior USI ("FR") including the placentas with brighter echogenicity ("P", framed by white crosses) and inner side of the uterus next to a uterus lumen with less echogenic foci ("L", in black) implying a liquid filling (Figure 1B, ED 16.5).

To exclude that mortality of the fetuses was due to the multiple handling of pregnant dams, we comparatively summarized these USI surveyed data establishing time kinetics after ZIKV challenge infection. In consequence, we observed significantly higher rates of fetal mortality in the ZIKV-infected group compared to mock-infected mice (Figure 1D). Moreover, the ZIKV-infected dams showed early signs of dead or resorbed fetuses on ED 10.5 accounting for 20% of the fetuses monitored. Subsequently, numbers of spontaneous abortion or intrauterine deaths increased over the following days resulting in almost 100% mortality on ED 16.5. However, in the PBS mock-infected group, first signs of fetal mortality were detected on ED 11.5, which constituted to 5% in the fetuses analyzed. Until ED 16.5 no increase in fetal mortality was observed confirming the ZIKV induced mortality in the fetuses.



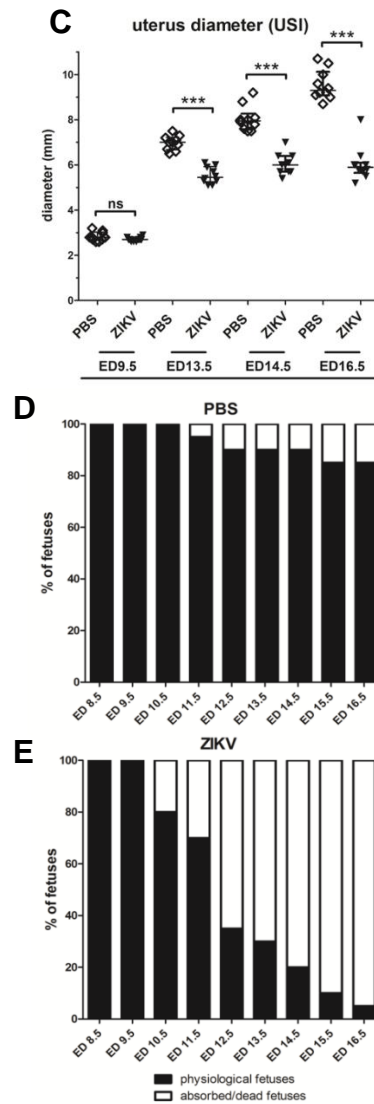


Figure 1. Embryonic day (ED) 4.5: **A + B:** A two-dimensional echocardiography image of the uterus showing the implantation site (uterus horn 1 (“U1”) and uterus horn 2 (“U2”) framed by white crosses) next to the bladder (“B”, shown in black) on ED 4.5.; ED 9.5: **A + B:** Echogenic foci of the uterus horns are prominent on ED 9.5.; ED 13.5: **A:** the placenta and the developing fetuses are visible (“P”, framed by white crosses, “F”) and the umbilical cord (“Uc”), **B:** the placenta is visible in the uterus lumen (“P”, framed by white crosses, “L”, shown in black) and indistinguishable fetal structures (“FR”); ED 14.5: **A:** growing fetus (“F”), with distinct structures such as the fetal head (“FH”), the umbilical cord (“Uc”) and the placenta (“P”, framed with white crosses) on ED 14.5, **B:** the uterus lumen is either filled with fetal residues including the placentas (“FR”, “P”, framed with white crosses) or empty on ED 14.5; ED 16.5: **A:** highly developed fetus with distinguishable fetal thorax, the fetal heart and paws (“F”, “FC”, “FP”) and the placenta (“P”, framed with white crosses) on ED 16.5, **B:** Uterus lumen (“L”, shown in black) including placentas with unclear fetal residuals on ED 16.5; **C:** Analysis

of uterus diameter using USI at different timepoints during pregnancy ($n = 8-10$ dams per group, graph represents 2–3 independent measurements per uterus). Differences between individual groups were analyzed by Mann–Whitney test. Error bars indicate the interquartile range (IQR) from the median. Asterisks represent statistically significant differences between two groups: ns = non-significant, *** $p = 0.0002$; **D**: Tabular summary of the ultrasound based findings as identified in **A** and **B** in the mock-infected mice ($n = 20$ fetuses, 4 examined fetuses/uterus ampoules per mouse and timepoint); **E**: Tabular summary of the ultrasound based findings as identified in **A** and **B** in the Zika virus (ZIKV)-infected mice ($n = 20$ fetuses, 4 examined fetuses/uterus ampoules per mouse and timepoint).

Evaluation of Uteroplacental Blood Flow Activity by Doppler Ultrasound

Direct Comparison between ED 13.5 and ED 16.5

Since the data so far confirmed intrauterine growth retardation (IUGR) and fetal death in ZIKV-infected pregnant IFNAR^{-/-} mice, we aimed to evaluate the ZIKV influence on the physiological parameters of the fetuses. For this we infected IFNAR^{-/-} mice on ED 7.5 with ZIKV or with PBS as control and comparatively monitored the fetal heart rate in the ZIKV-infected and PBS control group starting on ED 11.5 (Figure 2A). In the PBS mock-infected group, fetal heart rate started with a mean of 145 bpm on ED 11.5 and did not significantly change until ED 14.5, showing a slight upward trend to 150 bpm (referring to mean fetal heart rate). Between ED 11.5 to ED 16.5 fetal heart rate increased to a mean of 200 bpm, corresponding to the expected physiological value (KIM et al., 2013). ZIKV infection did not result in significantly different heart rate values (mean = 150 bpm on ED 11.5). However, it seemed that fetuses from the ZIKV-infected group showed a more distinctive increase of the heart rate between ED 11.5 and ED 14.5 indicating a mild type of fetal tachycardia. Interestingly, on ED 15.5 the fetal heart rate significantly decreased in the ZIKV-infected mice resulting in 140 bpm and on ED 16.5 fetuses only showed a rate of 50 bpm. From these data we concluded that ZIKV infection inadvertently influences the fetal circulatory system. However, since perceptible deviations on fetal heart rates were not identified before ED 15.5, we aimed also to comparatively monitor the blood flow activity in the uteroplacental vessels, which are essential for transfer of nutrients between mother and fetus (Figure 2B, C,

D). To enable a standardized characterization of the blood flow activity pattern, we used the highly echogenic placenta as starting point to perform Doppler-US. Starting on ED 7.5, Doppler ultrasonographic examination of uteroplacental circulation revealed evolving blood flow activity in the umbilical vessels. Of note, there was no obvious difference between the ZIKV-infected and mock-infected control mice until ED 13.5. We detected dynamic blood flow activity in the PBS control mice when analyzed on ED 13.5 as shown by the Color Doppler USI (Figure 2C). Doppler USI signals indicated productive recirculation of maternal blood to the fetus. Measurement of uterine artery diameter showed a mean of 0.85 mm. This is further confirmed on ED 16.5 when we detected umbilical and fetal blood vessels in comparable position. Color Doppler USI indicated that the vessel diameter was further dilated with a mean diameter of 0.93 mm. Moreover, the intensity of the signals was in line with a physiological proceeding of the pregnancy. When we performed Doppler USI in mice from the ZIKV-infected group, we were again able to specifically detect productive blood flow activity in the umbilical vessels adjacent to the placenta on ED 13.5 (Figure 2D). However, when measuring diameter of the uterine artery, we determined a mean of 0.36 mm. This diameter was smaller than the diameter in the mock control group. On ED 16.5 we again found the placenta to be a highly echogenic structure. However, on ED 16.5 we failed to detect any blood flow activity as seen by the lack of blue and red colored signals in Doppler USI. In detail, we did not observe any blood recirculation from the mother to the fetus. Moreover, confirming previous results, USI revealed undefined structures with high echogenicity indicating resorbed fetal tissue. When we summarized the data from Doppler USI, clear differences in blood flow activity were detected in ZIKV-infected dams compared to mock-infected control mice (Figure 2B). Interestingly, as early as ED 12.5 results from the Doppler USI allowed for the identification of ZIKV induced pathogenesis.

Since ZIKV infection has been associated with cerebral anomalies including microcephaly, we also assessed blood flow activity in the region of fetal head on ED 16.5 when USI allowed for differentiation of fetal structures (Figure 2E, F). In PBS mock-infected animals, color Doppler USI identified a productive blood circulation adjacent to the hyperechogenic fetal head

(Figure 2E). Again, when we analyzed the Doppler USI data on the vessel diameter over time, we detected significant differences in the perfusion of fetal heads in the PBS and ZIKV-infected groups on ED 16.5 (Figure 2E). Fetuses from PBS control dams revealed an effective blood flow activity that remained stable until end of the experiment (Figure 2F). However, in the ZIKV group, fetuses showed lower perfusion rates in the heads as seen by reduced vessel diameters (44% smaller compared to PBS) on ED 12.5. Over the following days the blood flow activity in the fetal heads significantly decreased to 25% compared to the level observed in the control group on ED 13.5 and no blood flow activity was detected on ED 14.5. These data indicated that ZIKV induced pathology targeting the fetal head is much earlier detectable than in the uteroplacental transfusion.

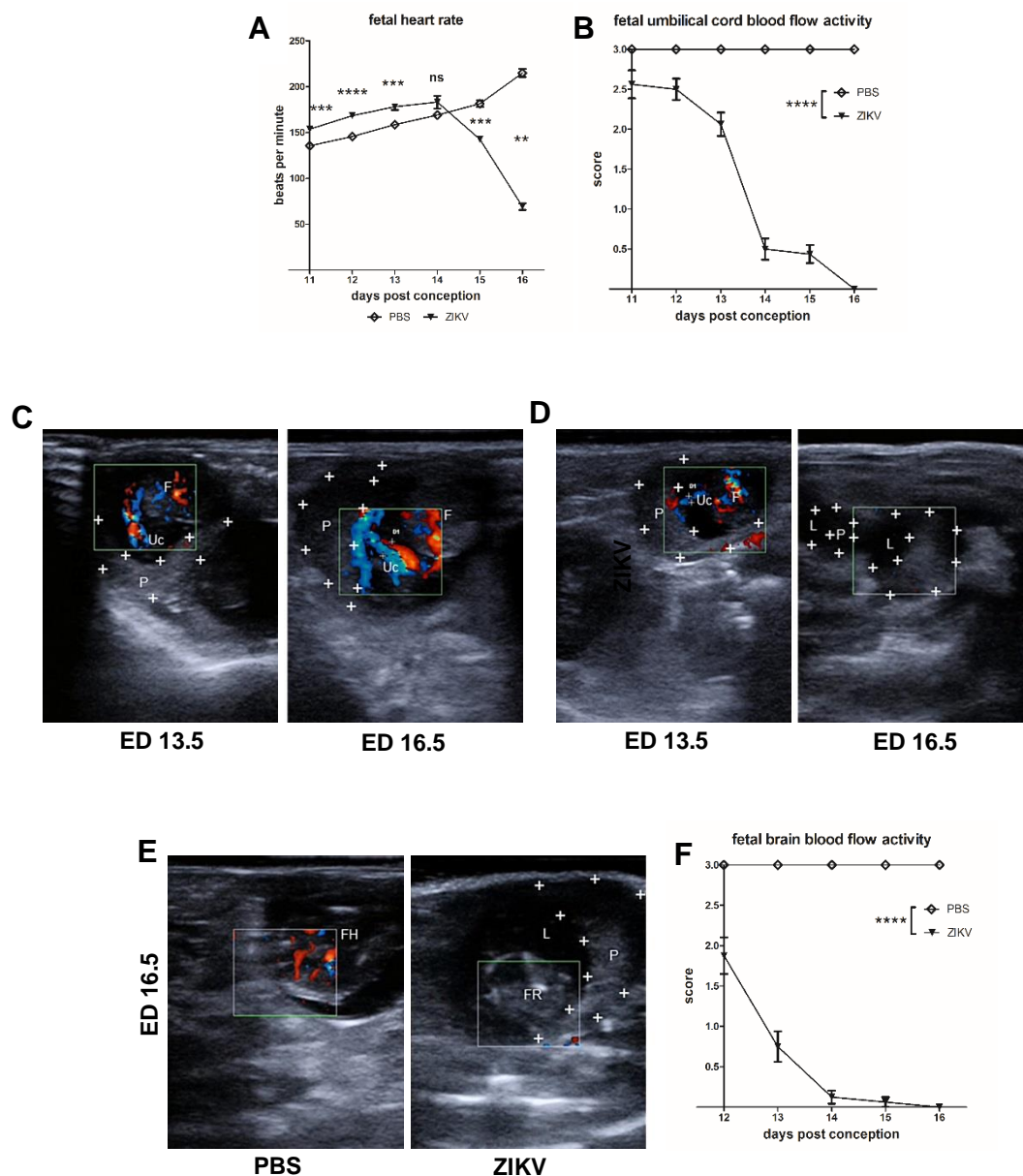


Figure 2. Ultrasound based demonstration of fetal blood flow activity and heart rate measured by Doppler ultrasound; **A + B:** Pregnant interferon receptor-deficient (IFNAR^{-/-}) mice were inoculated with PBS (mock-infected animals, used as controls) or with 10^3 plaque-forming-units (PFU) ZIKV on embryonic day 7.5 (ED 7.5). In all experiments, heart rates of individual fetuses were monitored daily ($n = 6-8$ fetuses per group). Data are representative of two experiments. Here: Graphical summary of the data obtained by Doppler measurements of uterine vessels blood flow activities (Figure 1A: error bars indicate SEMs and differences between the groups were analyzed by unpaired, two tailed t-test. Asterisks represent statistically significant differences between two groups; $n = ns$, $** p = 0.0012$, $*** p = 0.0002$, $**** p < 0.0001$, Figure 1B: error bars indicate SEMs and differences between the groups were analyzed by two-tailed t-test after calculation of the area under the curve, $**** p < 0.0001$); **C + D:** Measurement of the utero-placental blood flow activity in the uterine vessels obtained by Doppler-ultrasound on ED 13.5 and 16.5 for the PBS control mice and the ZIKV-infected mice.; **E:** Measurement of the blood flow activity in the fetal heads obtained by Doppler-ultrasound on ED 16.5 for the PBS control mice and the ZIKV-infected mice; **F:** Graphical summary of the data obtained by Doppler measurements of blood flow activities in the fetal heads ($n = 6-8$ fetuses per group); error bars indicate SEMs and differences between the groups were analyzed by two-tailed t-test after calculation of the area under the curve, $**** p < 0.0001$.

Characterization of ZIKV Infection of the Placenta

The placenta is considered as an important target organ for ZIKV infection resulting in direct transmission to the fetus (BRASIL et al., 2016; CAUCHEMEZ et al., 2016). Our USI data from pregnant mice demonstrated that the placenta can be detected as a clearly visible structure. To characterize the influence of ZIKV infection on the placental functionality in more detail, we comparatively monitored shape, thickness, and texture of the placenta in USI (Figure 3A). On ED 11.5, we observed no big differences in the placental thickness between ZIKV-infected and control mice with a mean thickness of 1.8 mm and 2.0 mm, respectively. Direct comparison in USI also indicated no obvious differences in the organ texture and density. However, on ED 14.5, placental thickness in ZIKV-infected mice was significantly lower than in the mock-infected control mice (Figure 3A, B). The mean thicknesses for the two groups were 1.96 mm and 2.82 mm

respectively (Figure 3B). In addition, USI revealed a modified appearance of the placental texture. Placentas from ZIKV-infected mice were brighter compared to the placentas of PBS controls indicating a higher echogenicity and echotexture. In contrast, the PBS infected placentas remained visible as a crescent shape with light colored staining (Figure 3A). This data was confirmed by uteroplacental pathology including histopathological analysis at the end of the experiment. Interestingly, the absolute placental weight was significantly lower in ZIKV-infected mice compared to controls (Figure 3C). The mean placental weight in the PBS control group was 0.125 g whereas placentas from ZIKV-infected mice had a mean weight of 0.05 g only. Moreover, the histopathological examination also revealed features of ZIKV infection in agreement with the differences in thickness and echogenicity determined by USI on ED 11.5.

Finally, when monitoring virus loads, we found large amounts of virus in the placentas of ZIKV-infected mice corroborating their importance as target organ during *in-vivo* infection (Figure 3D). Placentas of ZIKV-infected mice showed extensive ZIKV-specific staining, primarily in areas of the labyrinth zones severely affected by inflammation (Figure 3E). Several trophoblasts lines, like glycogen trophoblasts, spongiotrophoblasts, and to a lesser extent cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts showed antigen expression in a variable amount. Upon H&E staining, we detected large areas of densely packed inflammatory cells, mainly comprising lymphocytes and scattered macrophage-like cells as well as granulocytes in placentas from ZIKV-infected dams. Especially in the labyrinth zone, there seemed to be irregular shaped fetal capillaries in decreased numbers. Interestingly, these inflammatory processes seemed to be mainly associated in the labyrinth layer resulting in an obvious thinning of the placenta compared to mock-infected control mice (Figure 3F). Since IHC confirmed a direct ZIKV infection of placental cells, we aimed to correlate the reduced echogenicity in USI with direct effects of ZIKV infection. Of note, we specifically detected the presence of placental calcifications by Kossa-specific staining in the tissues from ZIKV-infected mice (Figure 3G). Interestingly these calcifications were mainly seen in the labyrinth zones around smaller vessels and some were filled with erythrocytes. Calcifications were visible

in the basal labyrinth zone near the chorionic epithelium of infected mice, whereas in the control group this was not visible.

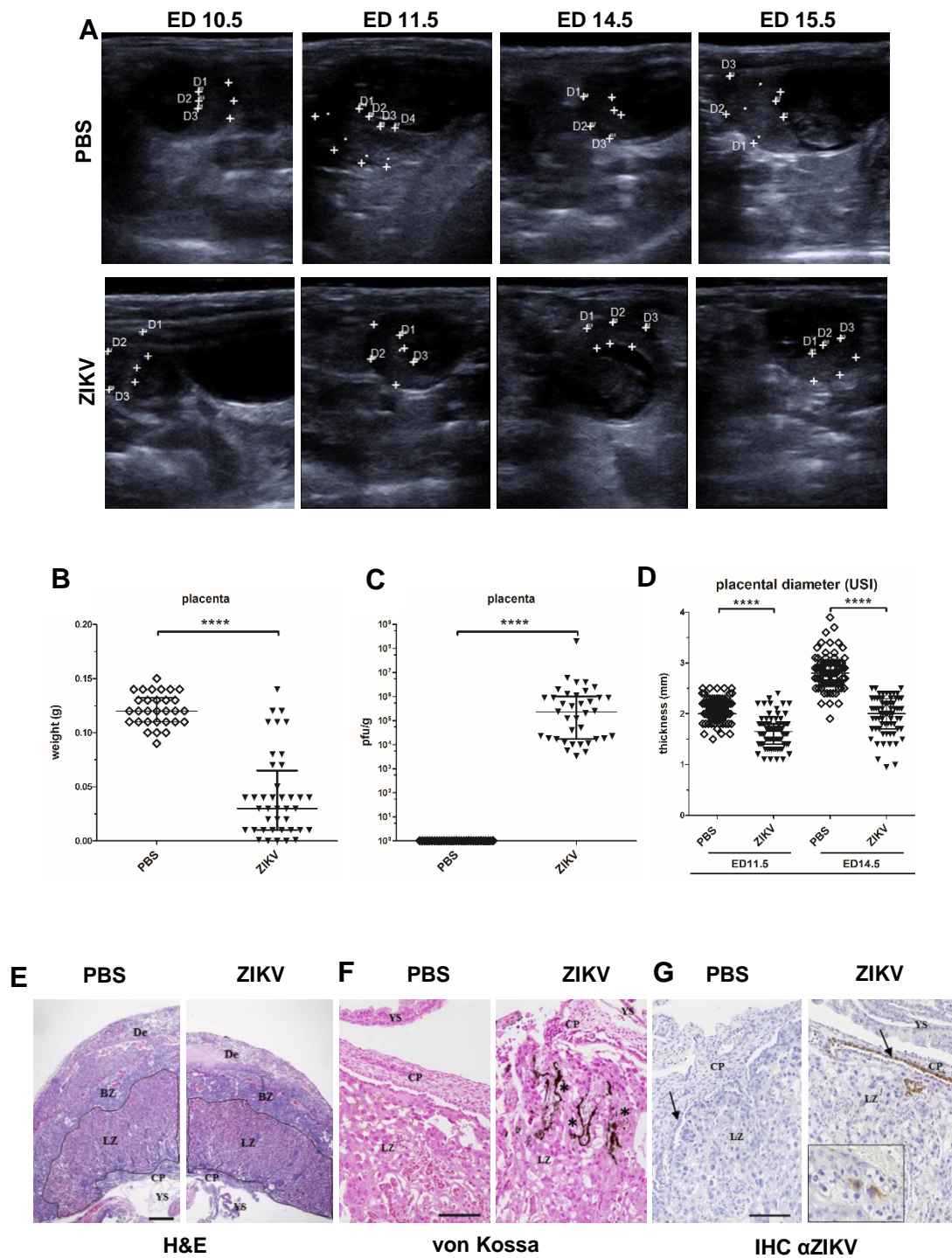


Figure 3. ZIKV induced changes in the placenta; **A:** Measurement of placenta thickness by ultrasound imaging. Representative images from ED 10.5, 11.5, 14.5, and 15.5 are depicted for PBS control mice and ZIKV-infected mice; **B:** Comparative evaluation of placental weights on ED 16.5 in sacrificed mice ($n = 8 - 10$ mice per group; differences between individual groups were analyzed by Mann–

Whitney test. Error bars indicate the interquartile range (IQR) from the median. Asterisks represent statistically significant differences between two groups: **** $p < 0.0001$; **C**: ZIKV challenge of pregnant mice results in highly productive ZIKV infection of placental tissues, virus titers in placentas after ZIKV infection. At the end of the experiments (ED 16.5) placentas were removed and homogenized, and the amount of virus was determined by plaque assays ($n = 31$ -39 placentas per group); data are representative of at least two independent experiments; differences between individual groups were analyzed by Mann–Whitney test. Error bars indicate the interquartile range (IQR) from the median. Asterisks represent statistically significant differences between two groups: **** $p < 0.0001$; **D**: placental diameter determined by ultrasound-based measurements comparing ED 11.5 and ED 14.5 ($n = 31$ -39 placentas per group); data are representative of at least two independent experiments; differences between individual groups were analyzed by Mann–Whitney test. Error bars indicate the interquartile range (IQR) from the median. Asterisks represent statistically significant differences between two groups: **** $p < 0.0001$; **E, F, G**: (De) decidua, (BZ) basal zone, (LZ) labyrinth zone, (CP) chorionic plate, and (YS) yolk sac. Histological analysis of placental tissues following ZIKV infection; **E**: Placentas were removed, and sections of the organs were routinely stained with hematoxylin and eosin (HE) Bar = 300 μm ; **F**: Sections of tissues were treated with von Kossa staining to identify tissue calcification Bar = 100 μm ; black asterisks indicate accumulations of dystrophic mineralization in the basal LZ of ZIKV-infected mice; **G**: Placenta, ED 16.5, immunohistochemical staining with αZIKV . Variable, prominent intracytoplasmic antigen expression in the chorionic epithelium (black arrow), in spongiotrophoblasts and glycotrophoblasts (inset) of the ZIKV-infected group, whereas all placentas of the control group including their chorionic epithelium (black arrow) were immunonegative. Bar = 100 μm .

Macroscopic Outcome and Viral Burden

To more closely compare the results from USI to a standard characterization of ZIKV induced pathogenesis in fetuses, we euthanized the mice on ED 16.5 and performed extensive necropsy. In addition to the placental pathology we focused on the mortality, viral burden, and size of fetuses. The data so far indicated that ZIKV infection invariably leads to fetal death or resorbed fetuses until ED 14.5-15.5. In line with these data, uteri obtained from ZIKV-infected dams did not contain any viable fetuses (Figure 4A). As already visualized in USI between ED 13.5 and ED 16.5, ZIKV uteri

contained multiple foci of fetal residues with the respective placenta surrounding a mass of former fetal tissue. In contrast, the uteri from mock PBS infected mothers contained multiple physiological fetuses each including the specific placenta. Of note, the ZIKV induced mortality and pathogenesis came along with massive inflammation resulting in resorption. This was seen by the presence of free liquids indicative for inflammatory processes as early as ED 13.5 (Figure 4B). Interestingly, we confirmed inflammation in necropsy on ED 16.5. When we characterized the structure of fetuses in more detail, mean length of fetuses was significantly smaller in the ZIKV-infected group compared to the control group (Figure 4D). Here, PBS control fetuses showed a mean size of 1.25 cm whereas the fetuses from ZIKV-infected animals had a mean of 0.5 cm. Moreover, the fetuses from the ZIKV-infected dams also showed significantly lower total weights with a mean of 0.11 g compared to 0.29 g in the viable fetuses from the PBS control group (Figure 4E). To determine whether fetal damage goes along with direct ZIKV infection in the fetus, we analyzed ZIKV infectious virus in fetal heads by plaques titration (Figure 4C). We found large amounts of virus with a mean of 10^7 PFU/g tissue in the ZIKV group. As expected, we failed to detect ZIKV in the PBS control group. To confirm productive infection in the dams, we also detected ZIKV in the brain and spinal cord, the main target organs of the virus (Figure 4F). Here, ZIKV-infected mice had high viral titers in the brain (10^7 PFU/g tissue) and the spinal cord with a mean of 5×10^6 PFU/g tissue. In addition, we also evaluated the viral loads in the ovaries and uteri to estimate the general impact of the infection on the reproductive tract (Figure 4F). Interestingly, we detected lower amounts of ZIKV in these organs compared to brain and spinal cord, with a mean of 10^4 PFU/g tissue for the uterus and a mean of 8×10^5 PFU/g tissue in the ovaries indicating a placenta derived transmission of blood borne ZIKV to the fetuses.

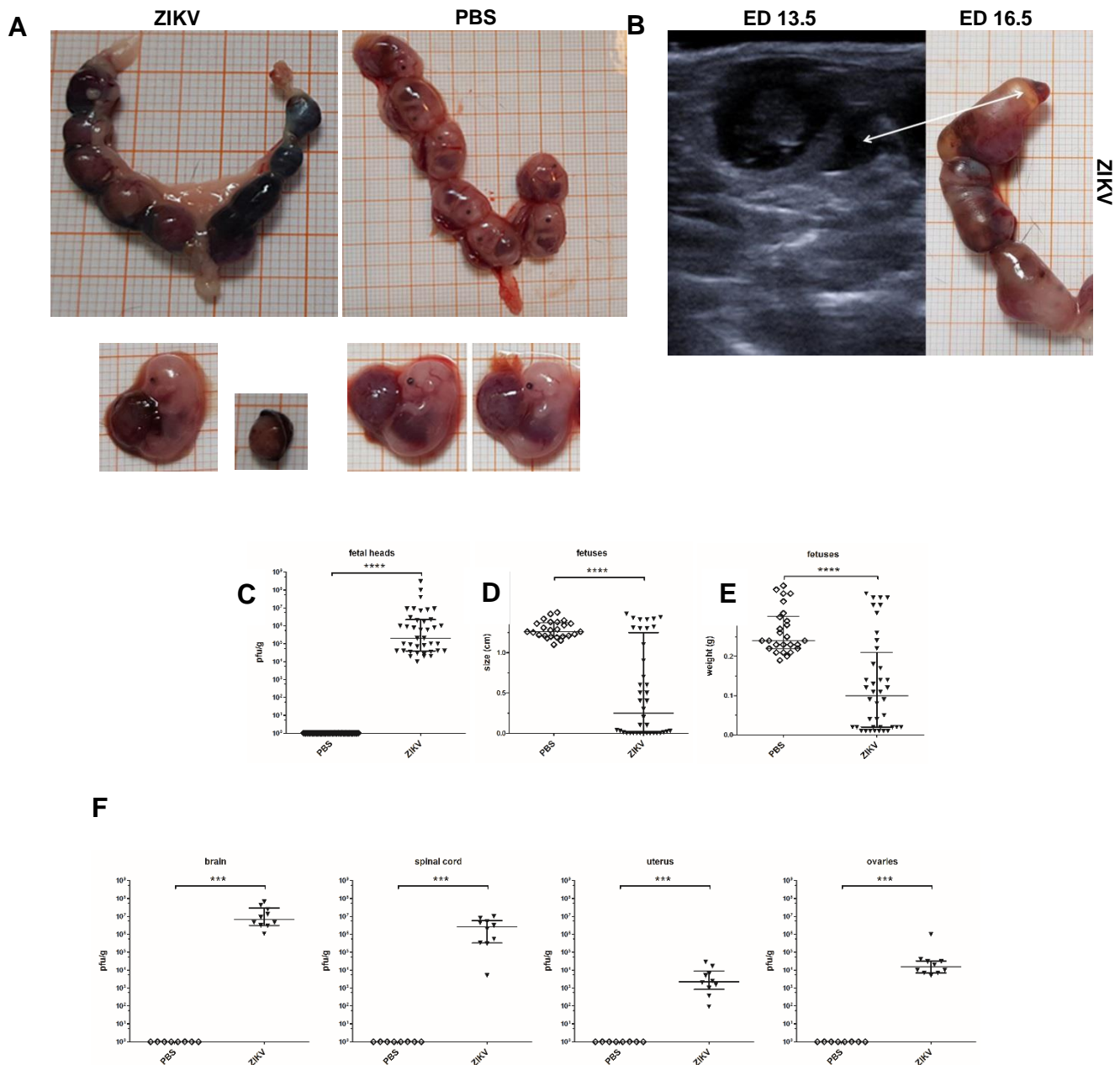


Figure 4. ZIKV induced pathology in the dams and the fetuses; **A:** Comparative macroscopical evaluation of the uterus and individual fetuses from mock-infected control animals and ZIKV-infected animals at the end of the experiment on ED 16.5; **B:** Representative ultrasound image of a ZIKV-infected uterus on ED 13.5 and the specific uterus of this ZIKV-infected animal on ED 16.5 at the end of the experiment; white arrow indicates fluid-filled areas which were already detected in USI at ED 13.5 and confirmed after necropsy; **C:** Virus titers in the fetuses (fetal head) after ZIKV infection. At the end of the experiments (ED 16.5) fetal heads were removed and homogenized, and the amount of virus was determined by plaque assays ($n = 31 - 39$ per group); data are representative of at least two independent experiments; **D + E:** ZIKV induced changes in size and weight of the

fetuses as evaluated at the end of the experiment; data are representative of at least two independent experiments; **F**: Virus titers in maternal organs (brain, spinal cord, uterus, ovaries) after ZIKV infection. At the end of the experiments (ED 16.5) organs were removed and homogenized, and the amount of virus was determined by plaque assays ($n = 8\text{--}10$ per group). Figures 4 C, D, E, F: differences between individual groups were analyzed by Mann–Whitney test. Error bars indicate the interquartile range (IQR) from the median. Asterisks represent statistically significant differences between two groups: *** $p = 0.0001$, **** $p < 0.0001$; and data are representative of at least two independent experiments.

Discussion

ZIKV infection during pregnancy has been confirmed to lead to severe congenital malformations and intrauterine death in human fetuses. During the 2015/2016 ZIKV epidemic, microcephaly was the predominant symptom of congenital ZIKV infection in newborns. So far, there are no vaccines or licensed therapeutics available. As a result, preclinical studies in mouse models of ZIKV infection during pregnancy are essential to evaluate therapeutic and preventive measurements. A major hurdle of such studies is to distinguish between ZIKV pathogenesis and immunopathology. Thus, we aimed to establish a new diagnostic approach to directly and rapidly follow the infection in fetal IFNAR^{-/-} mice. In this study we established USI as imaging tool to evaluate ZIKV induced pathology in fetal mice *in-vivo* during pregnancy. Using USI in pregnant IFNAR^{-/-} mice, we demonstrated fetal growth retardation and fetal death over time, indicating maternal-fetal transmission of ZIKV after infection on ED 7.5. In pregnant women, obstetric sonography is well established as safe diagnostic tool with clinical utility, which is supported by numerous human case reports and epidemiological studies. For ZIKV suspected cases, CDC recommends repeated diagnostic ultrasound imaging (every 3–4 weeks) to evaluate fetal anatomy, particularly the head circumferences and the growth (<https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/prenatal-care.html>). However, obstetric sonography is not commonly used to examine pregnant mice due to their short gestation time and the smaller size. For some other experimental approaches e.g., brain development studies or evaluation on mouse social behavior, USI on pregnant mice has been already used as valuable tool

(ANG et al., 2006; MCCLINTIC et al., 2014). The overall goal of our study was to contribute to the development of USI as for the monitoring of congenital infections in mice. We chose ZIKV as a model pathogen, and to best of our knowledge USI has not been tested as rapid diagnostic tool in a mouse model of ZIKV infection. Indeed, there are already published studies characterizing murine models of congenital Zika virus syndrome with regard to placental and fetal pathologies. Our objective was to analyze the course and outcome of ZIKV infection in the IFNAR^{-/-} mouse model. Different mouse models have been established as preclinical models to better understand ZIKV induced pathogenesis. Thus, mouse models also offer the opportunity to study influence of ZIKV infection for the fetuses using pregnant mice. Of course, mice are different from humans with regard to physiology and disease development. In detail, mice reveal a significantly shorter gestation time and the placental layers are different compared to humans. However, mice and humans both feature a hemochorial placenta (GEORGIADES et al., 2002; MALTEPE et al., 2010). From that aspect mouse studies might be appropriate to evaluate pathogenesis and countermeasures of congenital pathogens. As established by Miner et al. (MINER et al., 2016b), ZIKV infection in pregnant IFNAR^{-/-} mice results in a slightly different clinical outcome compared to the human ZIKV pathogenesis, since the fetuses do not show microcephaly, brain calcification and defects in brain development. However, this feature does not hamper the definition of fetoprotective countermeasures in the IFNAR^{-/-} pregnancy model. Miner et al. found a profound pathological change in ZIKV-infected placentas. Here, the hypothesis is that ZIKV infects the fetus through blood-placental transmission causing direct viral cytotoxicity. In addition, the fetus is also damaged due to the destruction of the placenta resulting in severe ischemia (LAZEAR et al., 2016). For our approach to study the effects of candidate vaccines or therapeutics to prevent ZIKV transmission to the fetus, this model might be well-suited. In the context of USI characterization, the first step was to visualize ZIKV induced changes in the fetus and in the placenta. Our results from daily USI of pregnant ZIKV-infected and mock-infected pregnant mice demonstrated that first visible signs of infection were observed on ED 13.5, which corresponds to the second trimester in human pregnancy. This is in line with the results from

case reports in humans. Here, after potential ZIKV infections during pregnancy, ultra-sonographic examination also identified first signs of ZIKV pathogenesis in the second trimester (MLAKAR et al., 2016). The leading symptom of ZIKV pathogenesis as evaluated in obstetric sonography was the growth retardation. This was also confirmed in our USI-mouse model. The sonography allows to specifically visualize fetal development and growth, as we were able to differentiate between the respective fetuses and the corresponding body parts. For this, fetal USI in mice might also contribute to other aspects of research questions involving pregnant mice. Of note, we did not detect distinct fetal structural abnormalities in single body parts. Instead we observed significant fetal growth retardation compared to the mock-infected fetuses. This obvious clinical parameter might allow to rapidly confirm fetoprotective countermeasure also in other applications. In this first approach, we did not observe significant modifications in the gross-morphological structure of the placentas from ZIKV-infected dams. This is different from the human case reports, where placentas already revealed visible calcification in the second trimester even though the placental thickness appeared normal (MLAKAR et al., 2016). Placenta pathology, e.g., calcifications, is likely more obvious in humans due to the comparatively longer gestation time. Thus, the extent of the calcifications is more advanced and better visible by USI. In addition, most of the human pregnancy comprises a single pregnancy. In contrast, mice harbor multiple pregnancies including multiple placentas. Thus, the USI analysis is more difficult in mice. Nevertheless, using histological methodology we could readily confirm mineralization of placental tissue in mice. Thus, the ZIKV mouse model is still to be considered as an appropriate model to study these pathological processes also due to the similar type of placentas (humans and mice both harbor a hemochorial placenta). However, when we specifically monitored the placental anatomy in more detail, the placenta thickness appeared to continuously decrease over the time starting about ED 11.5. This shrinking indicates a ZIKV induced pathological conversion of the physiological placental tissue in favor of calcifications. This has been already described in previous studies (AKIRAV et al., 2005). Here, placental thinning as identified by echogenic foci correlated with calcification of the placenta. This is further confirmed by

the post-mortem analysis of the placentas confirming that the significantly lower weights are a result of continued calcification. Placental calcification is an also common phenomenon in physiological pregnancy at term and is regarded as a physiological aging process (CHEN und CHEN, 2012; WAN MASLIZA et al., 2017). However, earlier placental calcification could be considered as a direct cytotoxic effect of ZIKV infection. Indeed, we detected significant amounts of ZIKV in placentas. This is in line with data from Hastings and colleagues who analyzed the influence of TAM receptors for the transmission of ZIKV through the transplacental route and replication of the virus in fetal tissues in the pregnant ZIKV mouse model (HASTINGS et al., 2017). Moreover, productive placental ZIKV infection, as visualized in USI, was further confirmed in gross morphological analysis. This is in line with the data from other preclinical ZIKV models. In pregnant rhesus macaques, Hirsch et al. (HIRSCH et al., 2018) showed placental infarctions with large gross vascular obliteration and villous stromal calcifications, which were a consequence of stromal fibroblast cell death. Another outcome of our placental ZIKV infection model was a reduced uteroplacental blood flow activity, which was measured using Doppler-USI. Interestingly, this observation appeared to be the most obvious and earliest sign of ZIKV pathogenesis when evaluating the course of disease by USI. Of note, the contribution of vascular restriction on fetal and placental growth on IUGR and decreasing cardiac output has already been confirmed in human studies (LANG et al., 2000; BROWNE et al., 2015). Since these alterations were already visible as early as ED 12.5 in the fetuses, this will allow for the evaluation of fetoprotection with a high sensitivity. In addition, using Doppler USI monitoring, as established in the ZIKV mouse model, the identification of possible effects of immunopathogenesis in control mice will be possible. To date we have a very limited understanding about the kinetics of immune responses during pregnancy. For example, we have limited knowledge of the mechanisms of vaccine-induced protection for the fetus after vaccination of the mother. This is also true for microbial defense during pregnancy. In this context, the placenta is known to be an active immunological organ orchestrating innate immune responses to protect the fetus by secretion of inflammatory cytokines. The type of reactivity initiated by the placenta dictates the outcome of the immunological response for the

fetus and the mother (PRABHUDAS et al., 2015). Thus, the availability of an imaging tool that allows for the classification of substances that are harmful and not harmful to fetuses has the potential to be valuable for other applications. We used this imaging tool to monitor blood flow activity in the fetal brain. Using this approach, we were able to detect visible differences between the mock-infected and ZIKV-infected group. However, a real correlation was not possible, as the profound effect of ZIKV infection on fetuses made it impossible to differentiate and locate the fetal heads by USI. This is in line with previous studies from Miner et al. In the mouse model, they did not detect ZIKV induced microcephaly as the major clinical outcome in newborn. This might be due to neurodevelopmental differences during embryogenesis in mice and humans (MINER et al., 2016b). In addition, our data indicate that ZIKV infection results in significant IUGR which in consequence probably induces efficient fetal resorption. This hypothesis would also explain the absence of microcephaly in the mouse model. In contrast, in the non-human primate model, ZIKV infection during pregnancy results in microcephaly and brain defects (HIRSCH et al., 2017). Of note, the hypothesis of rapid fetal remission is further supported by the findings of post-mortem evaluations. This has been confirmed in the uterus, where we revealed free liquids in USI indicative for massive reactivity and reorganization due to ZIKV induced pathogenesis. In summary, our USI based characterization of ZIKV disease in pregnant IFNAR^{-/-} revealed the suitability of this method to identify and correlate infection with pathogenesis. This is because we could directly confirm the findings as evaluated during the course of infection by USI with the results obtained after necropsy, which included viral titration and macroscopical findings. In future studies it will be interesting to combine such models of congenital ZIKV infection with USI and/or therapeutic countermeasures. Miner and Coyne used the pregnant mouse model to comparatively evaluate congenital infection and placental and fetal pathology (PLATT et al., 2018). In the next step they transferred the results from the mouse model to human placental explants. This approach will be also appealing to study other infections in the pregnant mouse model using USI/ US Doppler as intra vitam readout, e.g., other flaviviruses, murine cytomegalovirus, or toxoplasma gondii (ADAMS WALDORF et al., 2016; NISHIMURA et al.,

2017). Future work in this model will be particularly helpful to further analyze the influence of selected therapeutic and preventive agents on the outcome of infection in fetuses and mothers.

Funding: The work was funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF: "ZOOVAC"-project number 01KI1718 to A.V.) as part of the Research Network Zoonotic Infectious Diseases

Acknowledgments: We thank Stefanie Weber for expert help with ultrasound examination training, Silvia Adam-Neumair for preparing the histopathological slides, Sven Reese for profound help with statistical analysis, Georgia Kalodimou for proficient proofreading of the manuscript and Ursula Klostermeier, Patrizia Bonert, Johannes Döring, and Axel Groß who provided valuable help in animal studies.

V. DISKUSSION

Die so noch nie da gewesene Größe der in Südamerika erlebten ZIKV-Epidemie und die Bestätigung der Kausalität zwischen Infektion und Geburtsfehlern führten zu enormen globalen Reaktionen, einschließlich der Erklärung dieser Krise zum globalen Gesundheitsnotstand durch die WHO im Jahr 2016 (ORGANIZATION, 2016a). Die dramatischen Folgen für schwangere Frauen und deren Feten, allen voran die Mikrozephalie als Teil des CZS, enthüllten einen neuen Phänotyp der bislang harmlos geltenden ZIKV-Infektion (BRASIL et al., 2016). Vor allem in Anbetracht der olympischen Sommerspiele 2016 in Rio de Janeiro und der allgemeinen Globalisierung wuchs die Angst der weltweiten Ausbreitung.

Als sich das Zika Virus in Südamerika verbreitete, spiegelte dieses Geschehen das unverkennbare Muster wider, bei dem ein neuartiges Pathogen in eine bis dato immunologisch-naive Bevölkerung eingeschleppt wird. Das ZIKV breitete sich schnell und unaufhaltsam aus und führte dabei zu schwerwiegender kongenitaler Klinik. Der zugrundeliegende spezifische pathogene Mechanismus, der den Symptomen des CZS zugrunde liegt, ist immer noch unzureichend erforscht, aber Gegenstand laufender Untersuchungen (RUSSO et al., 2017).

Bisherige Erkenntnisse über die neuronale ZIKV-Infektion wurden anhand von *in-vitro*-Kulturen neuronaler Progenitorzellen gewonnen. Tang et al. berichteten, dass eine ZIKV-Replikation in humanen kortikalen Vorläuferzellen stattfindet, was zu einer verringerten Zellproliferation führt. Derartige Zellkultur-Modellsysteme wurden etabliert, um die schädlichen Auswirkungen des Virus auf die fetale Gehirnentwicklung zu untersuchen und ferner, um therapeutische Mittel dagegen zu testen (TANG et al., 2016). Warum das ZIKV als einziges Flavivirus *aktiv* die fetale Gehirngenese stört, wurde bisher noch nicht geklärt.

Bisher sind noch immer keine zugelassenen Impfstoffe oder Therapeutika verfügbar. Die Durchführung humaner Wirksamkeitsstudien wird durch die sinkende ZIKV-Inzidenz erschwert, welche sich durch die entwickelnde Herdenimmunität erklärt. Aus diesem Grund sind präklinische Studien in murinen Schwangerschaftsmodellen unerlässlich, um einen näheren

Einblick in die Auswirkungen der ZIKV-Infektion auf die fetale Entwicklung zu bekommen und gleichzeitig um den Effekt präventiver Mittel zu bewerten (MUSSO und GUBLER, 2016).

Dass sich das Tiermodell „Maus“ in Bezug auf Physiologie und Krankheitsentwicklung vom Menschen unterscheiden kann und manche darin gewonnene Erkenntnisse ab und an nicht direkt übertragbar sind, ist hinreichend bekannt (CAINE et al., 2018). Differenzen bestehen auch während der Schwangerschaft: Mäuse weisen beispielshalber eine deutlich kürzere Tragzeit auf und die Plazentaschichtung unterscheidet sich im Vergleich zum Menschen. Auch in vielen anderen Tiermodellen schränken anatomische und immunologische Divergenzen die direkte Übertragbarkeit von Befunden auf Erkrankungen des Menschen ein (SCHMIDT et al., 2015). Trotz allem rekapituliert der Großteil der etablierten ZIKV-Infektionsmodelle viele der Symptome, die auch beim Menschen auftreten (CAINE et al., 2018).

Obgleich die Plazentaschranke der Maus aus drei übereinanderliegenden Schichten von Synzytiotrophoblasten aufgebaut ist – im Gegensatz zu nur einer Schicht beim Menschen –, sind beide Plazentatypen „hämochorial“, stehen also in direktem Kontakt zu maternalem Blut (GEORGIADES et al., 2002; MALTEPE et al., 2010; COYNE und LAZEAR, 2016). Aufgrund dieser Tatsache kann das Mausmodell dennoch eine gute Plattform darstellen, um nützliche Einsichten in die kongenitale Pathogenese der humanen ZIKV-Infektion zu erhalten.

Ein vielversprechendes präklinisches Modell bieten Mauslinien, denen der Interferon-Alpha / Beta-Rezeptor (IFNAR^{-/-}) fehlt. Miner et al. gelang es, bei diesen trächtigen Mäusen eine transplazentäre ZIKV-Übertragung nachweisen und stellten im Zuge dessen auch fetale Anomalien wie IUGR, Plazentainsuffizienz bis hin zu fetalem Tod fest (MINER et al., 2016b). Zusammengefasst zeigt diese Klinik sehr große Ähnlichkeit zum CZS des Menschen. Hingegen war es ihnen nicht möglich Mikrozephalie, Gehirnverkalkungen oder andere Gehirnanomalien nachzuweisen, was somit zu einem geringfügig anderen klinischen Bild führte als beim Menschen. Aufgrund des Fehlens einzelner humaner klinischer Symptome wird eine Quantifizierung fetoprotektiver Maßnahmen im IFNAR^{-/-}-Modell jedoch nicht wesentlich eingeschränkt.

Ein sicheres diagnostisches Werkzeug, um die fetale Entwicklung frühzeitig überwachen und evaluieren zu können, ist die pränatale Ultraschalldiagnostik. Sie erweist sich während routinemäßiger Schwangerschaftsuntersuchungen als leicht handhabbares Hilfsmittel mit großem klinischem Nutzen. Auch bei ZIKV-Verdachtsfällen empfiehlt die CDC eine alle drei bis vier Wochen stattfindende sonographische Untersuchung des Fetus um dessen Entwicklung und Wachstum spezifisch visualisieren zu können (<https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/prenatal-care.html>).

Aufgrund der sinkenden Fallzahl humaner Infektionen ist es essentiell, die Pathogenese der ZIKV-Infektion im Mausmodell auch ultrasonographisch näher zu beleuchten, unter anderem auch um in späteren Studien die Klassifizierung und Evaluierung von für den Fetus protektiven Substanzen zu ermöglichen. Die Verfügbarkeit eines Bildgebungswerkzeugs könnte sich auch für andere Anwendungen als nützlich erweisen, bei denen für den Fetus schädliche Substanzen untersucht werden sollen (COYNE und LAZEAR, 2016).

Der Zweck dieser Arbeit war es, die Sonographie als neue diagnostische Möglichkeit zu etablieren, um die fetale ZIKV-Infektion in IFNAR^{-/-} Mäusen unmittelbar zu verfolgen und zu charakterisieren. In früheren Studien wurden zwar bereits ZIKV-induzierte pathologische Veränderungen der Plazenta und des Fetus charakterisiert (MINER et al., 2016b), doch das übergeordnete Ziel bestand darin, einen Beitrag zur Entwicklung der Ultraschalluntersuchung zur Überwachung kongenitaler Infektionen in Mausmodellen zu leisten.

Im NHP-Modell wird die nicht-invasive pränatale Ultraschalldiagnostik bereits erfolgreich angewendet, wie beispielsweise von Hirsch et al., um das fetale Wachstum, den uteroplazentären Blutfluss und den Fruchtwasserindex zu evaluieren (HIRSCH et al., 2018). Bei Mäusen wird die Trächtigkeitssonographie jedoch aufgrund der relativ kurzen Gestation und der geringen Tiergröße nur sehr sporadisch eingesetzt.

Bei humanen Ultraschalluntersuchungen war der offensichtlichste Effekt der ZIKV-Pathogenese die Einschränkung des fetalen Wachstums (IUGR). Diese Beobachtung konnte auch mithilfe der zu etablierenden bildgebenden Diagnostik im Mausmodell gemacht werden. Allerdings war es in dieser

Sache nicht möglich, ausgeprägte Strukturanomalien von einzelnen fetalen Körperteilen feststellen. Nach Belastungsinfektion an ED 7.5 erfolgte in diesem Mausmodell eine transplazentäre Übertragung des Virus auf den Fetus. Infolgedessen kam es ab ED 13.5 zu sichtbaren virusinduzierten Veränderungen im Vergleich zur physiologischen Entwicklung der Placebo-infizierten Feten. Dabei wurde bei beeinträchtigten Feten unter anderem eine signifikante Wachstumsverzögerung bis hin zum intrauterinen Tod beobachtet. Diese leicht zu erkennenden klinischen Parameter könnten dazu verwendet werden, Maßnahmen zur Fetoprotektion auch in anderen Fragestellungen schnell zu bestätigen.

Die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einer ZIKV-bedingten Schädigung des Fetus kommt, ist abhängig vom Zeitpunkt der Infektion (LIN et al., 2017). *In-vitro*-Untersuchungen an humanen Plazentaprobe ergaben, dass Synzytiotrophoblasten aus frühen Schwangerschaftsstadien von ZIKV infiziert werden können, dagegen aber nicht diejenigen aus späteren Stadien (SHERIDAN et al., 2017). Dieser Befund stützt die Hypothese einer verringerten ZIKV-Empfänglichkeit in späteren Trimestern. Das erste Trimester wird daher als der Zeitraum angesehen, in dem Feten am anfälligsten für eine Zika Infektion und die Entwicklung des CZS sind (EL COSTA et al., 2016; PETITT et al., 2017; GRAZEL und HARRIS-HAMAN, 2018).

Auch in Tiermodellen wurde vor allem bei Infektionen in der Frühschwangerschaft ein vermehrtes Auftreten fetaler Anomalien bestätigt. Im Mausmodell waren die ersten sonographisch augenfälligen Anzeichen der Infektion an ED 13.5 zu erkennen, was dem zweiten Trimester der humanen Schwangerschaft gleichkommt. Das steht im Einklang mit bisherigen Fallberichten beim Menschen, bei denen es im selben Zeitraum zu den ersten offensichtlichen Abweichungen der physiologischen Norm gekommen ist (MLAKAR et al., 2016).

Eine große Schwierigkeit bei Infektionsmodellen ist die Unterscheidung zwischen Virus-Pathogenese und Immunpathologie. Über die Kinetik von Immunantworten während der Schwangerschaft gibt es bisher nur begrenztes Wissen. Dasselbe gilt für die Abwehr von Mikroorganismen während der Schwangerschaft. Im Normalfall stellt die Plazenta eine solide Schutzbarriere dar und fungiert als aktives immunologisches Organ,

welches angeborene Immunantworten zum Schutz des Fetus koordiniert (COYNE und LAZEAR, 2016). Neben der Viruslast hat auch die Intensität der von der Plazenta ausgelösten Immunreaktion Einfluss auf die Auswirkungen für den Fetus und die Mutter (PRABHUDAS et al., 2015). Zum Beispiel wurde in für die Typ-I-IFN-Antwort defizienten Mausmodellen gezeigt, dass der plazentäre Typ-I-IFN Signalweg nicht mit unbedingt positivem Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit für fetale Resorption korreliert (YOCKEY et al., 2018). Heterozygote Nachkommen aus IFNAR^{-/-} Müttern und WT-Männchen verfügen per se über die Fähigkeit auf Typ-I-IFN zu reagieren. Allerdings wiesen diese Feten trotzdem keinen ausreichenden Schutz auf und ein Großteil davon wurde resorbiert (MINER et al., 2016b). Paradoxerweise wurde jedoch bei Feten mit vollständig defizientem IFN-Signalweg festgestellt, dass anteilig mehr Feten überlebten als bei denjenigen, die eine intakte IFN-Antwort besaßen. Wiederum war die plazentäre und fetale ZIKV-Belastung bei IFNAR^{-/-}×IFNAR^{-/-} höher als bei IFNAR^{-/-}×WTC57BL/6 Verpaarungen. Die Viruslast korrelierte damit nicht direkt mit der sichtbaren fetalen Resorptionsbilanz (YOCKEY et al., 2018). Damit konnte gezeigt werden, dass neben der viralen Pathogenese auch die maternale Immunpathologie bei Vorgängen fetaler Resorption eine Rolle spielen kann. Sie dient möglicherweise dabei als selektives Mittel, um die Entwicklung derjenigen Feten zu unterbrechen, welche bereits signifikanten Virusinfektionen oder Entzündungen ausgesetzt waren (CAINE et al., 2018).

Neben dem Fetalkompartiment stellt die Plazenta ein Hauptzielorgan der ZIKV-Infektion dar. In diesem Zusammenhang fanden Miner et al. in ZIKV-infizierten Plazenten tiefgreifende pathologische Veränderungen. Sie stellten dabei die Hypothese auf, dass das Virus den Fetus transplazentär infiziert, was zu direkter viraler Zytotoxizität führt (MINER et al., 2016b). Plazentäre Defekte sind in jedem Stadium der Schwangerschaft in der Lage fetale Schäden auszulösen. Durch derartige Läsionen kommt es zu schlechterer Sauerstoffversorgung der Zotten und als Folge zur fetalen Ischämie. Außerdem kommt es zu erhöhter Infiltration durch maternale Immunzellen, welche die Zottenarchitektur weiter in Mitleidenschaft ziehen und die Intaktheit der Plazentaschranke fortschreitend zerstören (COYNE und LAZEAR, 2016; NORONHA et al., 2016).

Bei der Ultraschalluntersuchung im Mausmodell konnte man vor ED 14.5 keine signifikanten Veränderungen in der morphologischen Struktur der Plazenta von ZIKV-infizierten Tieren beobachten. Dies unterscheidet sich von menschlichen Fallberichten, in denen Plazenten bereits im zweiten Trimester sonographisch sichtbare Verkalkungen aufwiesen, trotz normaler Plazentadiecke (MLAKAR et al., 2016). Womöglich sind sichtbare Verkalkungen beim Menschen aufgrund der vergleichsweise längeren Schwangerschaft leichter und öfter zu diagnostizieren, da zu diesem späteren Zeitpunkt das Ausmaß der pathologischen Plazentaveränderungen dann weiter fortgeschritten ist. Beim Menschen treten auch bei physiologischen Schwangerschaften placentäre Mineralisierungen auf, die dort allerdings als natürlicher Alterungsprozess angesehen werden (CHEN und CHEN, 2012; WAN MASLIZA et al., 2017). Eine dagegen signifikant früher einsetzende Verkalkung der Plazenta könnte man als Folge der direkten zytotoxischen Wirkung der ZIKV-Infektion betrachten.

Bei näherer ultrasonographischer Betrachtung der murinen placentären Morphologie scheint deren Wachstum beginnend ab ED 11.5 im Verlauf der Infektion kontinuierlich abzunehmen. Das weist auf eine ZIKV-induzierte pathologische Veränderung und Verkalkung des physiologischen Plazentagewebes hin. Dies wurde bereits in früheren humanen Studien beschrieben (AKIRAV et al., 2005), in denen die langsamere Zunahme des Plazentaquerschnitts mit dem Auftreten sonographisch echogener Herde (Verkalkungen) korrelierte. Mithilfe histologischer Nachweismethoden konnte aber auch hier im Mausmodell eine Mineralisierung des Plazentagewebes nachgewiesen werden. Weitere Befunde, die diese Hypothese stützen, wurden bei der post-mortem-Analyse gemacht, bei der signifikant niedrigere Plazentagewichte gemessen wurden, was womöglich als Ergebnis pathologischer Vorgänge und Verkalkungen anzusehen ist. In den Plazenten konnten außerdem erhebliche Mengen an ZIKV nachgewiesen werden. Diese produktive ZIKV-Infektion konnte auch makroskopisch durch Nekrose und Einblutungen in die Plazenta bestätigt werden.

Unter anderem wird durch diese beobachtete placentäre Pathologie deutlich, dass sich das ZIKV-Mausmodell trotz weniger speziebedingter

Unterschiede als geeignete Untersuchungsplattform für ZIKV-bedingte pathologische Prozesse eignet, auch begründet durch den recht ähnlichen hämochorialen Plazentatyp.

Ähnliche pathologische Prozesse wurden in NHP-Modellen beobachtet. Hirsch et al. waren in der Lage, plazentäre Infarkte mit starker vaskulärer Obliteration und villöser Stromaverkalkung als Folge des Absterbens von Stromafibroblasten nachzuweisen (HIRSCH et al., 2018).

Das nächste Resultat aus dem Mausschwangerschafts-Infektionsmodell war ein mithilfe des Doppler-Ultraschalls quantifizierbarer verminderter uteroplazentärer Blutfluss. Dieser Befund schien das am frühesten diagnostizierbare sonographische Anzeichen für die virale ZIKV-Pathogenese zu sein. Auch in humanen Studien wurde beschrieben, dass Gefäßverengungen negativen Einfluss auf das fetale und plazentäre Wachstum haben und damit als mitbestimmender Faktor für die IUGR fungieren (LANG et al., 2000; BROWNE et al., 2015). Da der reduzierte Blutfluss bereits an ED 12.5 zu erkennen war, könnte man ihn als sehr sensitives und früh messbares Charakteristikum heranziehen, um auf eine mögliche fetoprotektive Wirkung bestimmter Gegenmaßnahmen zu schließen.

Dieselbe Herangehensweise wurde dafür verwendet, die Durchblutung des fetalen Gehirns zu untersuchen. Auch hier konnten Unterschiede zwischen der ZIKV-infizierten und der Placebo-infizierten Gruppe festgestellt werden. Allerdings erwies es sich als schwierig, die Ergebnisse miteinander zu korrelieren, da es die dramatischen fetopathologischen Wirkungen des Virus vor allem im fortgeschrittenen Infektionsstadium aussichtslos machten, physiologisch-geformte fetale Köpfe zu erkennen. Dies entspricht Erkenntnissen aus früheren Studien von Miner et al., welchen es nicht gelang, im Mausmodell ZIKV-induzierte Mikrozephalie festzustellen (MINER et al., 2016b). Eine mögliche Erklärung für diese bei Mäusen fehlende Pathologie könnten neurologische Entwicklungsunterschiede während der murinen und humanen Embryogenese sein.

Die im Verlauf der Infektion ultrasonographisch sichtbaren fetalen Resorptionsvorgänge wurden eindrucksvoll durch die Ergebnisse der Sektion bestätigt. Außerdem enthielt der Uterus vieler Mäuse entzündliche Flüssigkeitsansammlungen, welche bereits im Vorfeld per

Ultraschalldiagnostik sichtbar gemacht werden konnten. Diese serösen Ansammlungen deuteten auf eine massive Reaktivität und Reorganisation des Gewebes infolge der ZIKV-Infektion hin.

Zusammenfassend war es mittels sonographischer Untersuchung im schwangeren IFNAR-/- Mausmodell somit möglich, die ZIKV-Infektion mit der Pathogenese zu korrelieren und diese intra vitam mitzuverfolgen. Sonographisch-diagnostizierte Befunde konnten post-mortem direkt bestätigt werden, einschließlich makroskopischer Anzeichen einer raschen fetalen Resorption und der durch Titration quantifizierbaren Virusmenge. Die Daten belegen eindrucksvoll, dass die ZIKV-Infektion an ED 7.5 im Mausmodell zu fetalen Entwicklungsstörungen und signifikanter IUGR führt, was gegebenenfalls das Absterben und infolgedessen die Resorption des Fetus einleitet. Das Auftreten von ZIKV-bedingten makroskopischen fetalen Schädigungen wurde ab ED 13.5 sonographisch festgestellt. Veränderungen der Plazenta, einem der Hauptzielorgane der ZIKV-Infektion, waren vor ED 14.5 noch nicht eindeutig erkennbar. Das erste Anzeichen der ZIKV-Pathogenese war an ED 12.5 eine gestörte und verminderte Durchblutung der Uteroplazentargefäße, was die Theorie einer Hypoxie-bedingten Schädigung der Feten weiter bestärkt.

Die in dieser Studie diagnostizierten Befunde wurden auch bei humanen ZIKV-Infektionen beobachtet. Daher könnte sich die ultrasonographische Untersuchung der ZIKV-Infektion im IFNAR-/- Mausmodell trotz weniger Speziesunterschiede zum Menschen gut dafür eignen, die zugrundeliegenden Faktoren der transplazentären Übertragung und der Teratogenität besser erforschen zu können.

Durch die immunitätsbedingte Abnahme humaner ZIKV-Fälle innerhalb der Bevölkerung wird es schwierig werden, neue Probanden für klinische Studien zu finden. Vorangegangene Zika-Infektionen immunisieren Frauen gegen spätere ZIKV-Infektionen und bewahren den Fetus in zukünftigen Schwangerschaften so vor nachteiligen Folgen. Aus solchen Schwangerschaften geborene Säuglinge wiesen keine Anzeichen von Mikrozephalie oder anderer Anomalien mehr auf. Sobald Frauen vor Erreichen des gebärfähigen Alters einer ZIKV-Infektion ausgesetzt waren, wird das Risiko virusbedingter Geburtsfehler auf ein Minimum reduziert werden.

Obwohl die Epidemie nachgelassen hat, stellt das Virus noch immer eine nicht zu vernachlässigende Bedrohung dar, wie durch Ausbrüche in Afrika, Asien und Indien aufgezeigt wird. Durch die große Anzahl empfänglicher, immunologisch-naiver Personen, die in Aedes befallenen Regionen leben, bleibt das Risiko bestehen, dass es in Zukunft erneut zu derartigen ZIKV-Ausbrüchen kommen kann (KRAEMER et al., 2019). Demzufolge werden Tiermodelle von substanziellem Nutzen sein, um diverse Fragestellungen zu behandeln und dadurch auf weitere ZIKV-Ausbrüche und das damit verbundene CZS besser vorbereitet zu sein. Die bisherigen Ausbrüche haben deutlich gemacht, wie groß unsere Wissenslücken im Verständnis der ZIKV-Pathogenese und Immunpathologie sind. Obwohl mehrere Tiermodelle etabliert wurden und viele Erkenntnisse daraus gewonnen wurden, bleiben weiterhin viele Fragen offen. Die genauen Mechanismen der Immunevasion und des Überwindens der Plazentaschranke sind noch immer nicht ausreichend erforscht. Die Basis, um zukünftigen Ausbrüchen besser entgegenzutreten zu können, besteht darin, die bestehenden Unklarheiten durch Erkenntnisse aus *in-vitro*- und vor allem *in-vivo*-Modellen zu beseitigen (CAINE et al., 2018).

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigen dabei die zukünftige Anwendung der Sonographie zur besseren Charakterisierung der ZIKV-Pathogenese in schwangeren IFNAR^{-/-} Mäusen. Der Einsatz fetaler Ultraschalldiagnostik erweist sich womöglich als ausschlaggebender Vorteil für ein besseres Verständnis der Gründe für die Entstehung kongenitaler Missbildungen in einem frühen Stadium der Mäuseschwangerschaft.

Die ultrasonographische Visualisierung der Pathogenese kann ferner dazu anregen, an anderen kongenitalen Infektionen, wie beispielsweise verschiedenen TORCH-Erregern, zu forschen (ADAMS WALDORF et al., 2016; NISHIMURA et al., 2017), um auch hier einen besseren Einblick in deren fetopathologische Prozesse zu bekommen. Es ist von enormer Wichtigkeit, die Mechanismen vertikaler Übertragung und kongenitaler Schädigungen weiter aufzuklären. Dafür sind Tiermodelle von entscheidender Bedeutung. Sie spielen nicht nur eine Schlüsselrolle beim Verständnis der pathologischen Mechanismen, sondern werden auch beim Ansatz, die Wirkungen und den Einfluss ausgewählter Impfstoffkandidaten und Therapeutika zu untersuchen, von großer Wichtigkeit sein.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ultrasonographische Charakterisierung kongenitaler Anomalien infolge der Zika Virus-Infektion im Mausmodell

Das ursprünglich 1952 entdeckte Zika Virus aus der Familie der Flaviviridae war lange Zeit nur mit relativ milder bis asymptomatischer Klinik mit leichtem Fieber und Hautausschlägen assoziiert. Als Arbovirus kann es vor allem durch blutsaugende Vektoren, insbesondere durch die Aedes-Stechmücke, übertragen werden. Ausgehend vom Zika Wald in Uganda breitete es sich über den Pazifik hinweg aus und wurde schließlich 2015 erstmals in Südamerika nachgewiesen. Die dort auftretende ZIKV-Epidemie mit über 1.3 Millionen Verdachtsfällen führte zum Auftreten eines neuartigen klinischen Phänotyps der ZIKV-Infektion. Es wurde von ZIKV-induziertem Guillain-Barré-Syndrom bei Erwachsenen und schweren kongenitalen Missbildungen wie Mikrozephalie bei Neugeborenen bis hin zu fetalem Tod berichtet.

Trotz groß angelegter Forschungsarbeit auf diesem Gebiet sind die Mechanismen der ZIKV-induzierten Schädigung des Fetus bis heute noch nicht vollständig verstanden, noch wurde eine kausale Therapie oder ein Impfstoff gegen das Virus entwickelt. Aufgrund der sinkenden humanen Fallzahl wird es in Zukunft schwierig werden, weiter an Gegenmaßnahmen zu forschen. Daher erweisen sich Tiermodelle während der Schwangerschaft als essentiell, um weitere Erkenntnisse zur fetalen ZIKV-Pathogenese zu erhalten. Ziel dieser Arbeit war es, die sonographische Untersuchung im trächtigen IFNAR -/- Mausmodell anzuwenden, um die spezifischen pathogenetischen Vorgänge der fetalen ZIKV-Infektion näher charakterisieren zu können. Dabei sollte eine diagnostische Grundlage für die Evaluierung potenzieller Impfstoffe und Gegenmittel geschaffen werden.

Die durch die Ultraschalluntersuchung gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass die Plazenta als primäres Zielorgan der ZIKV-Infektion gilt und es durch die darauffolgende Zerstörung der Plazentaschranke zur Infektion des Fetalkompartiments kommt. Zusätzlich führt die bereits ab ED 12.5

beobachtete verminderte uteroplazentäre Perfusion ebenso zu indirekter Schädigung und demzufolge zur IUGR des Fetus.

Ergebnisse dieser Studie bekräftigen den Einsatz der ultrasonographischen Untersuchung im präklinischen IFNAR -/- Mausmodell als Möglichkeit, einen besseren Einblick in die fetale ZIKV-Pathogenese zu erhalten. Die gewonnenen Daten bilden vor allem die Basis für zukünftige Evaluierungen bestimmter Gegenmaßnahmen oder Impfstoffkandidaten in Bezug auf ihre mögliche fetoprotektive Wirkung. Daneben erweist sich die pränatale Ultraschalldiagnostik gegebenenfalls gleichsam bei der Erforschung anderer kongenitaler Pathogene, wie beispielsweise jenen der TORCH-Gruppe als sehr hilfreich.

VII. SUMMARY

Ultrasonographic characterization of congenital anomalies due to Zika virus-infection in a mouse model

Zika Virus is a member of the Flaviviridae family and was originally discovered in 1952. It was associated with an only mild to asymptomatic clinic with relatively low fever and rash. As an arbovirus it is primarily transmitted by mosquito vectors, especially by *Aedes* mosquitoes. Starting from the Zika forest in Uganda, ZIKV spread across the Pacific and was finally detected in Brazil in 2015. The following ZIKV epidemic in South America occurred with over 1.3 million suspected cases and led to a hitherto unknown clinical phenotype and ZIKV-induced Guillain-Barré syndrome in adults and severe congenital malformations in newborns. Fetal deaths have been reported.

Despite focused research, the mechanisms of ZIKV-induced fetal damage have not been fully understood yet. Also, there are no therapies or vaccines available. Due to the declining number of human cases, it will be difficult to evaluate new countermeasures in the future. Therefore, animal models during pregnancy are essential in order to obtain further information on the fetal ZIKV pathogenesis. The aim of this study was to use sonographic examination in the pregnant IFNAR ^{-/-} mouse model in order to characterize the specific pathological processes of the fetal ZIKV-infection in more detail. It was the purpose to create a reliable diagnostic tool to evaluate candidate vaccines and antiviral therapies.

The obtained data from ultrasound examination indicate that the placenta is the primary target organ of the ZIKV infection. After the placental barrier has been damaged the fetal compartment is unprotected against the infection. In addition, starting from ED 12.5, a reduced uteroplacental blood flow was observed, which also leads to indirect damage and to IUGR of the fetus.

The results of this study confirm the use of ultrasonography in the IFNAR ^{-/-} mouse model as a good method to get a closer insight and a better understanding of the fetal ZIKV-pathogenesis. The obtained data form the basis for future evaluations of new countermeasures or candidate vaccines

with regard to their possible fetoprotective effects. In addition, prenatal ultrasound diagnostic may also be very helpful in the topic of other congenital pathogens, such as those of the TORCH group.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abrams RPM, Solis J, Nath A. Therapeutic Approaches for Zika Virus Infection of the Nervous System. *Neurotherapeutics* 2017; 14: 1027-48.

Adams KM, Nelson JL. Microchimerism: an investigative frontier in autoimmunity and transplantation. *Jama* 2004; 291: 1127-31.

Adams Waldorf KM, Stencel-Baerenwald JE, Kapur RP, Studholme C, Boldenow E, Vornhagen J, Baldessari A, Dighe MK, Thiel J, Merillat S, Armistead B, Tisoncik-Go J, Green RR, Davis MA, Dewey EC, Fairgrieve MR, Gatenby JC, Richards T, Garden GA, Diamond MS, Juul SE, Grant RF, Kuller L, Shaw DW, Ogle J, Gough GM, Lee W, English C, Hevner RF, Dobyns WB, Gale M, Jr., Rajagopal L. Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. *Nat Med* 2016; 22: 1256-9.

Adams Waldorf KM, Nelson BR, Stencel-Baerenwald JE, Studholme C, Kapur RP, Armistead B, Walker CL, Merillat S, Vornhagen J, Tisoncik-Go J, Baldessari A, Coleman M, Dighe MK, Shaw DWW, Roby JA, Santana-Ufret V, Boldenow E, Li J, Gao X, Davis MA, Swanstrom JA, Jensen K, Widman DG, Baric RS, Medwid JT, Hanley KA, Ogle J, Gough GM, Lee W, English C, Durning WM, Thiel J, Gatenby C, Dewey EC, Fairgrieve MR, Hodge RD, Grant RF, Kuller L, Dobyns WB, Hevner RF, Gale M, Jr., Rajagopal L. Congenital Zika virus infection as a silent pathology with loss of neurogenic output in the fetal brain. *Nat Med* 2018; 24: 368-74.

Adebanjo T, Godfred-Cato S, Viens L, Fischer M, Staples JE, Kuhnert-Tallman W, Walke H, Oduyebo T, Polen K, Peacock G, Meaney-Delman D, Honein MA, Rasmussen SA, Moore CA. Update: Interim Guidance for the Diagnosis, Evaluation, and Management of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection - United States, October 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017; 66: 1089-99.

Agbulos DS, Barelli L, Giordano BV, Hunter FF. Zika Virus: Quantification, Propagation, Detection, and Storage. *Curr Protoc Microbiol* 2016; 43: 15d.4.1-d.4.6.

Akirav C, Lu Y, Mu J, Qu DW, Zhou YQ, Slevin J, Holmyard D, Foster FS, Adamson SL. Ultrasonic detection and developmental changes in calcification of the placenta during normal pregnancy in mice. *Placenta* 2005; 26: 129-37.

- Ang ES, Jr., Gluncic V, Duque A, Schafer ME, Rakic P. Prenatal exposure to ultrasound waves impacts neuronal migration in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 12903-10.
- ANONYMUS. Ultrasound screening for fetal microcephaly following Zika virus exposure. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 214: B2-4.
- Aubry M, Finke J, Teissier A, Roche C, Broult J, Paulous S, Despres P, Cao-Lormeau VM, Musso D. Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011-2013. *Int J Infect Dis* 2015; 41: 11-2.
- Barrows NJ, Campos RK, Liao KC, Prasanth KR, Soto-Acosta R, Yeh SC, Schott-Lerner G, Pompon J, Sessions OM, Bradrick SS, Garcia-Blanco MA. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem Rev* 2018; 118: 4448-82.
- Basurko C, Carles G, Youssef M, Guindi WE. Maternal and fetal consequences of dengue fever during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 147: 29-32.
- Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. An update on Zika virus infection. *Lancet* 2017; 390: 2099-109.
- Bayer A, Lennemann NJ, Ouyang Y, Bramley JC, Morosky S, Marques ET, Jr., Cherry S, Sadovsky Y, Coyne CB. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* 2016; 19: 705-12.
- Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan WO. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. *Mol Biol Evol* 2003; 20: 1650-8.
- Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill* 2014; 19
- Brasil P, Pereira JP, Jr., Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, Rabello RS, Valderramos SG, Halai UA, Salles TS, Zin AA, Horovitz D, Daltro P, Boechat M, Raja Gabaglia C, Carvalho de Sequeira P, Pilotto JH, Medialdea-Carrera R, Cotrim da Cunha D, Abreu de Carvalho LM, Pone M, Machado Siqueira A, Calvet GA, Rodrigues Baiao AE, Neves ES, Nassar de Carvalho PR, Hasue RH, Marschik PB, Einspieler C, Janzen C, Cherry JD, Bispo de Filippis AM, Nielsen-Saines K. Zika Virus Infection

- in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med* 2016; 375: 2321-34.
- Brault AC, Domi A, McDonald EM, Talmi-Frank D, McCurley N, Basu R, Robinson HL, Hellerstein M, Duggal NK, Bowen RA, Guirakhoo F. A Zika Vaccine Targeting NS1 Protein Protects Immunocompetent Adult Mice in a Lethal Challenge Model. *Sci Rep* 2017; 7: 14769.
- Browne VA, Julian CG, Toledo-Jaldin L, Cioffi-Ragan D, Vargas E, Moore LG. Uterine artery blood flow, fetal hypoxia and fetal growth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015; 370: 20140068.
- Bruenn JA. A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 1821-9.
- Buckley A, Gould EA. Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 8): 1913-20.
- Caine EA, Jagger BW, Diamond MS. Animal Models of Zika Virus Infection during Pregnancy. *Viruses* 2018; 10
- Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, Araujo ESM, de Sequeira PC, de Mendonca MCL, de Oliveira L, Tschoeke DA, Schrago CG, Thompson FL, Brasil P, Dos Santos FB, Nogueira RMR, Tanuri A, de Filippis AMB. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 653-60.
- Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, Sall AA, Musso D. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1085-6.
- Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, Dub T, Baudouin L, Teissier A, Larre P, Vial AL, Decam C, Choumet V, Halstead SK, Willison HJ, Musset L, Manuguerra JC, Despres P, Fournier E, Mallet HP, Musso D, Fontanet A, Neil J, Ghawche F. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* 2016; 387: 1531-9.
- Cao B, Diamond MS, Mysorekar IU. Maternal-Fetal Transmission of Zika Virus: Routes and Signals for Infection. *J Interferon Cytokine Res* 2017; 37: 287-94.
- Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, Dub T, Guillemette-Artur P, Eyrolle-

- Guignot D, Salje H, Van Kerkhove MD, Abadie V, Garel C, Fontanet A, Mallet HP. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. *Lancet* 2016; 387: 2125-32.
- Chambers TJ, McCourt DW, Rice CM. Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. *Virology* 1989; 169: 100-9.
- Chen KH, Chen LR. PP096. The effect of preterm placental calcification on uteroplacental blood flow, fetal growth and perinatal outcome in hypertension complicating pregnancy. *Pregnancy Hypertens* 2012; 2: 292.
- Colpitts TM (2016) *West Nile Virus: Methods and Protocols*. Springer New York
- Corona-Rivera JR, Corona-Rivera E, Romero-Velarde E, Hernandez-Rocha J, Bobadilla-Morales L, Corona-Rivera A. Report and review of the fetal brain disruption sequence. *Eur J Pediatr* 2001; 160: 664-7.
- Costa F, Sarno M, Khouri R, de Paula Freitas B, Siqueira I, Ribeiro GS, Ribeiro HC, Campos GS, Alcantara LC, Reis MG, Weaver SC, Vasilakis N, Ko AI, Almeida AR. Emergence of Congenital Zika Syndrome: Viewpoint From the Front Lines. *Ann Intern Med* 2016; 164: 689-91.
- Coyne CB, Lazear HM. Zika virus - reigniting the TORCH. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14: 707-15.
- Crabtree MB, Kinney RM, Miller BR. Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses. *Arch Virol* 2005; 150: 771-86.
- Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimaraes KP, Benazzato C, Almeida N, Pignatari GC, Romero S, Polonio CM, Cunha I, Freitas CL, Brandao WN, Rossato C, Andrade DG, Faria Dde P, Garcez AT, Buchpiguel CA, Braconi CT, Mendes E, Sall AA, Zanotto PM, Peron JP, Muotri AR, Beltrao-Braga PC. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 2016; 534: 267-71.
- D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, de Lamballerie X, Hubert B, Piorkowski G, Maquart M, Descamps D, Damond F, Leparç-Goffart I. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N Engl J Med* 2016; 374: 2195-8.
- Davidson A. Suspected female-to-male sexual transmission of Zika virus—New York City, 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 2016; 65

- de Carvalho Leal M, Ramos DS, Caldas Neto SS. Hearing Loss From Congenital Zika Virus Infection. *Top Magn Reson Imaging* 2019; 28: 19-22.
- Delaney A, Mai C, Smoots A, Cragan J, Ellington S, Langlois P, Breidenbach R, Fornoff J, Dunn J, Yazdy M. Population-based surveillance of birth defects potentially related to Zika virus infection—15 states and US territories, 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2018; 67: 91.
- Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952; 46: 509-20.
- do Rosario MS, de Jesus PA, Vasilakis N, Farias DS, Novaes MA, Rodrigues SG, Martins LC, Vasconcelos PF, Ko AI, Alcantara LC, de Siqueira IC. Guillain-Barre Syndrome After Zika Virus Infection in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2016; 95: 1157-60.
- Dos Santos T, Rodriguez A, Almiron M, Sanhueza A, Ramon P, de Oliveira WK, Coelho GE, Badaro R, Cortez J, Ospina M, Pimentel R, Masis R, Hernandez F, Lara B, Montoya R, Jubithana B, Melchor A, Alvarez A, Aldighieri S, Dye C, Espinal MA. Zika Virus and the Guillain-Barre Syndrome - Case Series from Seven Countries. *N Engl J Med* 2016; 375: 1598-601.
- Driggers RW, Ho CY, Korhonen EM, Kuivanen S, Jaaskelainen AJ, Smura T, Rosenberg A, Hill DA, DeBiasi RL, Vezina G, Timofeev J, Rodriguez FJ, Levantov L, Razak J, Iyengar P, Hennenfent A, Kennedy R, Lanciotti R, du Plessis A, Vapalahti O. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N Engl J Med* 2016; 374: 2142-51.
- Dudley DM, Aliota MT, Mohr EL, Weiler AM, Lehrer-Brey G, Weisgrau KL, Mohns MS, Breitbach ME, Rasheed MN, Newman CM, Gellerup DD, Moncla LH, Post J, Schultz-Darken N, Schotzko ML, Hayes JM, Eudailey JA, Moody MA, Permar SR, O'Connor SL, Rakasz EG, Simmons HA, Capuano S, Golos TG, Osorio JE, Friedrich TC, O'Connor DH. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nat Commun* 2016; 7: 12204.
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 2009; 360: 2536-43.
- Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, Huguon E, Descoux E. Infectious Zika

- viral particles in breastmilk. *Lancet* 2016; 387: 1051.
- El Costa H, Gouilly J, Mansuy JM, Chen Q, Levy C, Cartron G, Veas F, Al-Daccak R, Izopet J, Jabrane-Ferrat N. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Sci Rep* 2016; 6: 35296.
- Faria NR, Azevedo R, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, Theze J, Bonsall MB, Bowden TA, Rissanen I, Rocco IM, Nogueira JS, Maeda AY, Vasami F, Macedo FLL, Suzuki A, Rodrigues SG, Cruz ACR, Nunes BT, Medeiros DBA, Rodrigues DSG, Queiroz ALN, da Silva EVP, Henriques DF, da Rosa EST, de Oliveira CS, Martins LC, Vasconcelos HB, Casseb LMN, Simith DB, Messina JP, Abade L, Lourenco J, Alcantara LCJ, de Lima MM, Giovanetti M, Hay SI, de Oliveira RS, Lemos PDS, de Oliveira LF, de Lima CPS, da Silva SP, de Vasconcelos JM, Franco L, Cardoso JF, Vianez-Junior J, Mir D, Bello G, Delatorre E, Khan K, Creatore M, Coelho GE, de Oliveira WK, Tesh R, Pybus OG, Nunes MRT, Vasconcelos PFC. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* 2016; 352: 345-9.
- Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med* 2016; 374: 601-4.
- Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JV, Diallo M, Zannotto PM, Sall AA. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e2636.
- Ferguson NM, Cucunuba ZM, Dorigatti I, Nadjati-Gilani GL, Donnelly CA, Basanez MG, Nouvellet P, Lessler J. EPIDEMIOLOGY. Countering the Zika epidemic in Latin America. *Science* 2016; 353: 353-4.
- Fields BN, Knipe DM, Howley PM (2007) *Fields' Virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins
- Fontes CA, Dos Santos AA, Marchiori E. Magnetic resonance imaging findings in Guillain-Barre syndrome caused by Zika virus infection. *Neuroradiology* 2016; 58: 837-8.
- Forster D, Schwarz JH, Brosinski K, Kalinke U, Sutter G, Volz A. Obstetric Ultrasonography to Detect Fetal Abnormalities in a Mouse Model for Zika Virus Infection. *Viruses* 2020; 12
- Franca GV, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, Henriques CM, Carmo EH, Pedi VD, Nunes ML, Castro MC, Serruya S, Silveira MF, Barros FC, Victora CG.

- Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet* 2016; 388: 891-7.
- Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 2002; 23: 3-19.
- Gollins SW, Porterfield JS. Flavivirus infection enhancement in macrophages: an electron microscopic study of viral cellular entry. *J Gen Virol* 1985; 66 (Pt 9): 1969-82.
- Gorman MJ, Caine EA, Zaitsev K, Begley MC, Weger-Lucarelli J, Uccellini MB, Tripathi S, Morrison J, Yount BL, Dinno KH, 3rd, Ruckert C, Young MC, Zhu Z, Robertson SJ, McNally KL, Ye J, Cao B, Mysorekar IU, Ebel GD, Baric RS, Best SM, Artyomov MN, Garcia-Sastre A, Diamond MS. An Immunocompetent Mouse Model of Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* 2018; 23: 672-85.e6.
- Gould EA, de Lamballerie X, Zanotto PM, Holmes EC. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. *Adv Virus Res* 2003; 59: 277-314.
- Gould EA, Higgs S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103: 109-21.
- Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 84-6.
- Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, Schwarz MC, Sanchez-Seco MP, Evans MJ, Best SM, Garcia-Sastre A. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe* 2016; 19: 882-90.
- Grazel R, Harris-Haman P. Zika Virus Infection: A Vector-Borne Threat to Pregnant Women and Infants. *Adv Neonatal Care* 2018; 18: 350-9.
- Grigsby PL. Animal Models to Study Placental Development and Function throughout Normal and Dysfunctional Human Pregnancy. *Semin Reprod Med* 2016; 34: 11-6.
- Grubaugh ND, Ishtiaq F, Setoh YX, Ko AI. Misperceived Risks of Zika-related Microcephaly in India. *Trends Microbiol* 2019; 27: 381-3.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:

480-96.

Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 2002; 33: 330-42.

Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health* 2011; 39: 3-11.

Guillemette-Artur P, Besnard M, Eyrolle-Guignot D, Jouannic JM, Garel C. Prenatal brain MRI of fetuses with Zika virus infection. *Pediatr Radiol* 2016; 46: 1032-9.

Haby MM, Pinart M, Elias V, Reveiz L. Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review. *Bull World Health Organ* 2018; 96: 402-13d.

Halstead SB. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis* 1979; 140: 527-33.

Hastings AK, Yockey LJ, Jagger BW, Hwang J, Uraki R, Gaitsch HF, Parnell LA, Cao B, Mysorekar IU, Rothlin CV, Fikrig E, Diamond MS, Iwasaki A. TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. *Cell Rep* 2017; 19: 558-68.

Heinz FX, Stiasny K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2017; 81

Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65: 55-8.

Hermanns K, Gohner C, Kopp A, Schmidt A, Merz WM, Markert UR, Junglen S, Drosten C. Zika virus infection in human placental tissue explants is enhanced in the presence of dengue virus antibodies in-vitro. *Emerg Microbes Infect* 2018; 7: 198.

Hills SL, Russell K, Hennessey M, Williams C, Oster AM, Fischer M, Mead P. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65: 215-6.

Hirsch AJ, Smith JL, Haese NN, Broeckel RM, Parkins CJ, Kreklywich C, DeFilippis VR, Denton M, Smith PP, Messer WB, Colgin LM, Ducore RM, Grigsby PL, Hennebold JD, Swanson T, Legasse AW, Axthelm MK, MacAllister R,

- Wiley CA, Nelson JA, Streblow DN. Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006219.
- Hirsch AJ, Roberts VHJ, Grigsby PL, Haese N, Schabel MC, Wang X, Lo JO, Liu Z, Kroenke CD, Smith JL, Kelleher M, Broeckel R, Kreklywich CN, Parkins CJ, Denton M, Smith P, DeFilippis V, Messer W, Nelson JA, Hennebold JD, Grafe M, Colgin L, Lewis A, Ducore R, Swanson T, Legasse AW, Axthelm MK, MacAllister R, Moses AV, Morgan TK, Frias AE, Streblow DN. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. *Nat Commun* 2018; 9: 263.
- Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 644-58.
- Imperato PJ. The Convergence of a Virus, Mosquitoes, and Human Travel in Globalizing the Zika Epidemic. *J Community Health* 2016; 41: 674-9.
- Ioos S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect* 2014; 44: 302-7.
- Jagger BW, Miner JJ, Cao B, Arora N, Smith AM, Kovacs A, Mysorekar IU, Coyne CB, Diamond MS. Gestational Stage and IFN-lambda Signaling Regulate ZIKV Infection In Utero. *Cell Host Microbe* 2017; 22: 366-76.e3.
- Johansson MA, Mier-y-Teran-Romero L, Reefhuis J, Gilboa SM, Hills SL. Zika and the Risk of Microcephaly. *N Engl J Med* 2016; 375: 1-4.
- Joob B, Wiwanitkit V. Fetal Magnetic Resonance Imaging of Fetus With Zika Virus Infection. *Pediatr Neurol* 2017; 68: e1.
- Kim K, Shresta S. Neuroteratogenic Viruses and Lessons for Zika Virus Models. *Trends Microbiol* 2016; 24: 622-36.
- Kim W, Seidah NG, Prat A. In utero measurement of heart rate in mouse by noninvasive M-mode echocardiography. *J Vis Exp* 2013: e50994.
- Kraemer MU, Reiner RC, Brady OJ, Messina JP, Gilbert M, Pigott DM, Yi D, Johnson K, Earl L, Marczak LB. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nature microbiology* 2019; 4: 854-63.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT,

- Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002; 108: 717-25.
- Kuno G. Transmission of arboviruses without involvement of arthropod vectors. *Acta Virol* 2001; 45: 139-50.
- Kuno G, Chang GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol* 2007; 152: 687-96.
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1232-9.
- Lang U, Baker RS, Khoury J, Clark KE. Effects of chronic reduction in uterine blood flow on fetal and placental growth in the sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279: R53-9.
- Laureti M, Narayanan D, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK, Kedzierski L. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front Immunol* 2018; 9: 2180.
- Lawn ND, Wijedicks EF. Fatal Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 1999; 52: 635-8.
- Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, Diamond MS. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe* 2016; 19: 720-30.
- Lazear HM, Diamond MS. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. *J Virol* 2016; 90: 4864-75.
- Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, Zhang N, Shi L, Qin CF, Xu Z. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* 2016a; 19: 120-6.
- Li H, Saucedo-Cuevas L, Shresta S, Gleeson JG. The Neurobiology of Zika Virus. *Neuron* 2016b; 92: 949-58.
- Li X, Ma SJ, Liu X, Jiang LN, Zhou JH, Xiong YQ, Ding H, Chen Q. Immunogenicity and safety of currently available Japanese encephalitis vaccines: a systematic review. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10: 3579-93.
- Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo SS, Lee SA, Ge J, Wang S, Goldman SA,

- Zlokovic BV, Zhao Z, Jung JU. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* 2016; 19: 663-71.
- Lin HZ, Tambyah PA, Yong EL, Biswas A, Chan SY. A review of Zika virus infections in pregnancy and implications for antenatal care in Singapore. *Singapore Med J* 2017; 58: 171-8.
- Lindenbach B, Murray C, Thiel H, Rice C. Flaviviridae. *Fields Virology*. Knipe DM, editor 2013: 712-46.
- Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003; 59: 23-61.
- Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA, Khromykh AA. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J Virol* 2006; 80: 2396-404.
- Liu Y, Liu J, Du S, Shan C, Nie K, Zhang R, Li XF, Zhang R, Wang T, Qin CF, Wang P, Shi PY, Cheng G. Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature* 2017; 545: 482-6.
- Lobigs M. Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 6218-22.
- Lum FM, Low DK, Fan Y, Tan JJ, Lee B, Chan JK, Renia L, Ginhoux F, Ng LF. Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces Inflammation. *Clin Infect Dis* 2017; 64: 914-20.
- Luo D, Xu T, Watson RP, Scherer-Becker D, Sampath A, Jahnke W, Yeong SS, Wang CH, Lim SP, Strongin A, Vasudevan SG, Lescar J. Insights into RNA unwinding and ATP hydrolysis by the flavivirus NS3 protein. *Embo j* 2008; 27: 3209-19.
- Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3414-9.
- Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 1996; 220: 232-40.

- Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* 1998; 245: 203-15.
- Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1954; 48: 139-45.
- Magnani DM, Rogers TF, Maness NJ, Grubaugh ND, Beutler N, Bailey VK, Gonzalez-Nieto L, Gutman MJ, Pedreno-Lopez N, Kwal JM, Ricciardi MJ, Myers TA, Julander JG, Bohm RP, Gilbert MH, Schiro F, Aye PP, Blair RV, Martins MA, Falkenstein KP, Kaur A, Curry CL, Kallas EG, Desrosiers RC, Goldschmidt-Clermont PJ, Whitehead SS, Andersen KG, Bonaldo MC, Lackner AA, Panganiban AT, Burton DR, Watkins DI. Fetal demise and failed antibody therapy during Zika virus infection of pregnant macaques. *Nat Commun* 2018; 9: 1624.
- Malone RW, Homan J, Callahan MV, Glasspool-Malone J, Damodaran L, Schneider Ade B, Zimler R, Talton J, Cobb RR, Ruzic I, Smith-Gagen J, Janies D, Wilson J. Zika Virus: Medical Countermeasure Development Challenges. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10: e0004530.
- Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ. The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J Clin Invest* 2010; 120: 1016-25.
- Mansuy JM, Dutertre M, Mengelle C, Fourcade C, Marchou B, Delobel P, Izopet J, Martin-Blondel G. Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 405.
- Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg* 1969; 18: 411-5.
- Marcondes CB, Ximenes Mde F. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. *Rev Soc Bras Med Trop* 2016; 49: 4-10.
- Martinot AJ, Abbink P, Afacan O, Prohl AK, Bronson R, Hecht JL, Borducchi EN, Larocca RA, Peterson RL, Rinaldi W, Ferguson M, Didier PJ, Weiss D, Lewis MG, De La Barrera RA, Yang E, Warfield SK, Barouch DH. Fetal Neuropathology in Zika Virus-Infected Pregnant Female Rhesus Monkeys. *Cell* 2018; 173: 1111-22.e10.

- McClintic AM, King BH, Webb SJ, Mourad PD. Mice exposed to diagnostic ultrasound in utero are less social and more active in social situations relative to controls. *Autism Res* 2014; 7: 295-304.
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 135-45.
- Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, Le Charpentier T, Hafirassou ML, Zamborlini A, Cao-Lormeau VM, Couplier M, Misse D, Jouvenet N, Tabibiazar R, Gressens P, Schwartz O, Amara A. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep* 2017; 18: 324-33.
- Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, Balmaseda A, Harris E. CD14(+)CD16(+) monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat Microbiol* 2017; 2: 1462-70.
- Mier YT-RL, Delorey MJ, Sejvar JJ, Johansson MA. Guillain-Barre syndrome risk among individuals infected with Zika virus: a multi-country assessment. *BMC Med* 2018; 16: 67.
- Miller S, Sparacio S, Bartenschlager R. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J Biol Chem* 2006; 281: 8854-63.
- Miner JJ, Sene A, Richner JM, Smith AM, Santeford A, Ban N, Weger-Lucarelli J, Manzella F, Ruckert C, Govero J, Noguchi KK, Ebel GD, Diamond MS, Apte RS. Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. *Cell Rep* 2016a; 16: 3208-18.
- Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, Garber C, Noll M, Klein RS, Noguchi KK, Mysorekar IU, Diamond MS. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell* 2016b; 165: 1081-91.
- Miner JJ, Diamond MS. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe* 2017; 21: 134-42.
- Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljsak-Prijatelj M, Mraz J, Kolenc M, Resman Rus K, Vesnaver Vipotnik T, Fabjan Vodusek V, Vizjak A, Pizem J, Petrovec M, Avsic Zupanc T. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med* 2016; 374: 951-8.

- Modrow S, Falke D (1997) Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag
- Morain SR, Wootton SH, Eppes C. A devastating delay—Zika and the implementation gap. *New England Journal of Medicine* 2017; 377: 1505-7.
- Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994; 264: 1918-21.
- Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, Shan Yan A, Cao-Lormeau VM, Broult J. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill* 2014a; 19
- Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect* 2014b; 20: O595-6.
- Musso D, Nhan T-X. Emergence of Zika virus. *Clinical Microbiology: Open Access* 2015;
- Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis* 2015a; 21: 359-61.
- Musso D, Roche C, Nhan TX, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol* 2015b; 68: 53-5.
- Musso D, Cao-Lormeau VM, Gubler DJ. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *Lancet* 2015c; 386: 243-4.
- Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev* 2016; 29: 487-524.
- Musso D, Ko AI, Baud D. Zika Virus Infection - After the Pandemic. Reply. *N Engl J Med* 2020; 382: e3.
- Neal JW. Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS? *J Infect* 2014; 69: 203-15.
- Nguyen SM, Antony KM, Dudley DM, Kohn S, Simmons HA, Wolfe B, Salamat MS, Teixeira LBC, Wiepz GJ, Thoong TH, Aliota MT, Weiler AM, Barry GL, Weisgrau KL, Vosler LJ, Mohns MS, Breitbach ME, Stewart LM, Rasheed MN, Newman CM, Graham ME, Wieben OE, Turski PA, Johnson KM, Post J, Hayes JM, Schultz-Darken N, Schotzko ML, Eudailey JA, Permar SR, Rakasz EG, Mohr EL, Capuano S, 3rd, Tarantal AF, Osorio JE, O'Connor SL, Friedrich TC, O'Connor DH, Golos TG. Highly efficient maternal-fetal Zika virus transmission in pregnant rhesus macaques. *PLoS Pathog* 2017;

13: e1006378.

Nishimura M, Umeda K, Suwa M, Furuoka H, Nishikawa Y. CCR5 Is Involved in Interruption of Pregnancy in Mice Infected with *Toxoplasma gondii* during Early Pregnancy. *Infect Immun* 2017; 85

Nogueira RM, de Araujo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica* 2007; 22: 358-63.

Noronha Ld, Zanluca C, Azevedo MLV, Luz KG, Santos CNDd. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2016; 111: 287-93.

Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastere S, Valour F, Baudouin L, Mallet H, Musso D, Ghawche F. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill* 2014; 19

Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; 47: 6-7.

Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75: 389-93.

Organization WH (2016a) WHO Director-General summarizes the outcomes of the emergency committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome

Organization WH (2016b) Assessment and management of Guillain-Barré syndrome in the context of Zika virus infection: interim guidance update. World Health Organization

Organization WH (2016c) Prevention of sexual transmission of Zika virus: interim guidance update. World Health Organization

Oster AM, Brooks JT, Stryker JE, Kachur RE, Mead P, Pesik NT, Petersen LR. Interim Guidelines for Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus - United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65: 120-1.

Pacheco O, Beltran M, Nelson CA, Valencia D, Tolosa N, Farr SL, Padilla AV, Tong VT, Cuevas EL, Espinosa-Bode A, Pardo L, Rico A, Reefhuis J, Gonzalez M, Mercado M, Chaparro P, Martinez Duran M, Rao CY, Munoz MM,

- Powers AM, Cuellar C, Helfand R, Huguett C, Jamieson DJ, Honein MA, Ospina Martinez ML. Zika Virus Disease in Colombia - Preliminary Report. *N Engl J Med* 2016;
- Paploski IA, Prates AP, Cardoso CW, Kikuti M, Silva MM, Waller LA, Reis MG, Kitron U, Ribeiro GS. Time Lags between Exanthematous Illness Attributed to Zika Virus, Guillain-Barre Syndrome, and Microcephaly, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2016; 22: 1438-44.
- Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. *N Engl J Med* 2016; 374: 1552-63.
- Petitt M, Tabata T, Puerta-Guardo H, Harris E, Pereira L. Zika virus infection of first-trimester human placentas: utility of an explant model of replication to evaluate correlates of immune protection ex vivo. *Curr Opin Virol* 2017; 27: 48-56.
- Pierson T, Diamond M (2013) Flaviviruses. *Fields Virology*, eds Knipe DM, Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia)
- Platt DJ, Smith AM, Arora N, Diamond MS, Coyne CB, Miner JJ. Zika virus-related neurotropic flaviviruses infect human placental explants and cause fetal demise in mice. *Sci Transl Med* 2018; 10
- Polen KD, Gilboa SM, Hills S, Oduyebo T, Kohl KS, Brooks JT, Adamski A, Simeone RM, Walker AT, Kissin DM, Petersen LR, Honein MA, Meaney-Delman D. Update: Interim Guidance for Preconception Counseling and Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus for Men with Possible Zika Virus Exposure - United States, August 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018; 67: 868-71.
- Pomar L, Malinger G, Benoist G, Carles G, Ville Y, Rousset D, Hcini N, Pomar C, Jolivet A, Lambert V. Association between Zika virus and fetopathy: a prospective cohort study in French Guiana. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 49: 729-36.
- PrabhuDas M, Bonney E, Caron K, Dey S, Erlebacher A, Fazleabas A, Fisher S, Golos T, Matzuk M, McCune JM, Mor G, Schulz L, Soares M, Spencer T, Strominger J, Way SS, Yoshinaga K. Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. *Nat Immunol* 2015; 16: 328-34.
- Prisant N, Bujan L, Benichou H, Hayot PH, Pavili L, Lurel S, Herrmann C, Janky

- E, Joguet G. Zika virus in the female genital tract. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 1000-1.
- Pryor MJ, Wright PJ. Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. *J Gen Virol* 1994; 75 (Pt 5): 1183-7.
- Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med* 2016; 374: 1981-7.
- Rosenfeld AB, Doobin DJ, Warren AL, Racaniello VR, Vallee RB. Replication of early and recent Zika virus isolates throughout mouse brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: 12273-8.
- Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 538-48.
- Russo FB, Jungmann P, Beltrao-Braga PCB. Zika infection and the development of neurological defects. *Cell Microbiol* 2017; 19
- Sarathy VV, White M, Li L, Gorder SR, Pyles RB, Campbell GA, Milligan GN, Bourne N, Barrett AD. A lethal murine infection model for dengue virus 3 in AG129 mice deficient in type I and II interferon receptors leads to systemic disease. *J Virol* 2015; 89: 1254-66.
- Schmidt A, Morales-Prieto DM, Pastuschek J, Froehlich K, Markert UR. Only humans have human placentas: molecular differences between mice and humans. *Journal of reproductive immunology* 2015; 108: 65-71.
- Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* 2011; 1: 519-25.
- Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, Doriqui MJ, Neri JI, Neto JM, Wanderley HY, Cernach M, El-Husny AS, Pone MV, Seroo CL, Sanseverino MT. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65: 59-62.
- Sepulveda W, Rojas I, Robert JA, Schnapp C, Alcalde JL. Prenatal detection of velamentous insertion of the umbilical cord: a prospective color Doppler ultrasound study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; 21: 564-9.
- Shan C, Muruato AE, Jagger BW, Richner J, Nunes BT, Medeiros DBA, Xie X, Nunes JGC, Morabito KM, Kong WP, Pierson TC, Barrett AD, Weaver SC,

- Rossi SL, Vasconcelos PFC, Graham BS, Diamond MS, Shi PY. A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage. *Nat Commun* 2017; 8: 676.
- Shapiro-Mendoza CK, Rice ME, Galang RR, Fulton AC, VanMaldeghem K, Prado MV, Ellis E, Anesi MS, Simeone RM, Petersen EE, Ellington SR, Jones AM, Williams T, Reagan-Steiner S, Perez-Padilla J, Deseda CC, Beron A, Tufa AJ, Rosinger A, Roth NM, Green C, Martin S, Lopez CD, deWilde L, Goodwin M, Pagano HP, Mai CT, Gould C, Zaki S, Ferrer LN, Davis MS, Lathrop E, Polen K, Cragan JD, Reynolds M, Newsome KB, Huertas MM, Bhatangar J, Quinones AM, Nahabedian JF, Adams L, Sharp TM, Hancock WT, Rasmussen SA, Moore CA, Jamieson DJ, Munoz-Jordan JL, Garstang H, Kambui A, Masao C, Honein MA, Meaney-Delman D. Pregnancy Outcomes After Maternal Zika Virus Infection During Pregnancy - U.S. Territories, January 1, 2016-April 25, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017; 66: 615-21.
- Sheridan MA, Yunusov D, Balaraman V, Alexenko AP, Yabe S, Verjovski-Almeida S, Schust DJ, Franz AW, Sadovsky Y, Ezashi T, Roberts RM. Vulnerability of primitive human placental trophoblast to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: E1587-e96.
- Shi Y, Li S, Wu Q, Sun L, Zhang J, Pan N, Wang Q, Bi Y, An J, Lu X, Gao GF, Wang X. Vertical Transmission of the Zika Virus Causes Neurological Disorders in Mouse Offspring. *Sci Rep* 2018; 8: 3541.
- Slayden OD. Cyclic remodeling of the nonhuman primate endometrium: a model for understanding endometrial receptivity. *Semin Reprod Med* 2014; 32: 385-91.
- Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses* 2011; 3: 160-71.
- Steel A, Gubler DJ, Bennett SN. Natural attenuation of dengue virus type-2 after a series of island outbreaks: a retrospective phylogenetic study of events in the South Pacific three decades ago. *Virology* 2010; 405: 505-12.
- Stouffer RL, Woodruff TK. Nonhuman Primates: A Vital Model for Basic and Applied Research on Female Reproduction, Prenatal Development, and Women's Health. *Ilar j* 2017; 58: 281-94.
- Szaba FM, Tighe M, Kummer LW, Lanzer KG, Ward JM, Lanthier P, Kim IJ, Kuki A, Blackman MA, Thomas SJ, Lin JS. Zika virus infection in

- immunocompetent pregnant mice causes fetal damage and placental pathology in the absence of fetal infection. *PLoS Pathog* 2018; 14: e1006994.
- Tabata T, Petitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C, Fang-Hoover J, Harris E, Pereira L. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* 2016; 20: 155-66.
- Takaki H, Oshiumi H, Shingai M, Matsumoto M, Seya T. Development of mouse models for analysis of human virus infections. *Microbiol Immunol* 2017; 61: 107-13.
- Tambyah PA, Koay ES, Poon ML, Lin RV, Ong BK. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N Engl J Med* 2008; 359: 1526-7.
- Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, Yao B, Shin J, Zhang F, Lee EM, Christian KM, Didier RA, Jin P, Song H, Ming GL. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* 2016; 18: 587-90.
- Teixeira MG, Costa Mda C, de Oliveira WK, Nunes ML, Rodrigues LC. The Epidemic of Zika Virus-Related Microcephaly in Brazil: Detection, Control, Etiology, and Future Scenarios. *Am J Public Health* 2016; 106: 601-5.
- The Lancet Infectious D. The dengue vaccine dilemma. *Lancet Infect Dis* 2018; 18: 123.
- Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog* 2007; 3: e201.
- van der Linden V, Pessoa A, Dobyns W, Barkovich AJ, Junior HV, Filho EL, Ribeiro EM, Leal MC, Coimbra PP, Aragao MF, Vercosa I, Ventura C, Ramos RC, Cruz DD, Cordeiro MT, Mota VM, Dott M, Hillard C, Moore CA. Description of 13 Infants Born During October 2015-January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth - Brazil. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65: 1343-8.
- Vannice KS, Cassetti MC, Eisinger RW, Hombach J, Knezevic I, Marston HD, Wilder-Smith A, Cavaleri M, Krause PR. Demonstrating vaccine effectiveness during a waning epidemic: A WHO/NIH meeting report on approaches to development and licensure of Zika vaccine candidates.

- Vaccine 2019; 37: 863-8.
- Ventura CV, Maia M, Bravo-Filho V, Gois AL, Belfort R, Jr. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet* 2016a; 387: 228.
- Ventura CV, Maia M, Dias N, Ventura LO, Belfort R, Jr. Zika: neurological and ocular findings in infant without microcephaly. *Lancet* 2016b; 387: 2502.
- Wan Masliza WD, Bajuri MY, Hassan MR, Naim NM, Shuhaila A, Das S. Sonographically abnormal placenta: an association with an increased risk poor pregnancy outcomes. *Clin Ter* 2017; 168: e283-e9.
- Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 2010; 85: 328-45.
- Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med* 2015; 372: 1231-9.
- Wells MF, Salick MR, Wiskow O, Ho DJ, Worringer KA, Ihry RJ, Kommineni S, Bilican B, Klim JR, Hill EJ, Kane LT, Ye C, Kaykas A, Eggan K. Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. *Cell Stem Cell* 2016; 19: 703-8.
- Wu J, Lu G, Zhang B, Gong P. Perturbation in the conserved methyltransferase-polymerase interface of flavivirus NS5 differentially affects polymerase initiation and elongation. *J Virol* 2015; 89: 249-61.
- Yockey LJ, Jurado KA, Arora N, Millet A, Rakib T, Milano KM, Hastings AK, Fikrig E, Kong Y, Horvath TL. Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. *Science immunology* 2018; 3: eaao1680.
- Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 2008; 319: 1834-7.
- Zhu Z, Chan JF, Tee KM, Choi GK, Lau SK, Woo PC, Tse H, Yuen KY. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. *Emerg Microbes Infect* 2016; 5: e22.

IX. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Gerd Sutter für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen anfertigen zu können, für seine wertvollen Ratschläge und die stets freundliche Unterstützung. Besonders bedanken möchte ich mich auch für die Möglichkeit meine Ergebnisse auf Kongressen in Hamburg und Berlin präsentieren und sie als Publikation veröffentlichen zu dürfen.

Ein Dankeschön auch an meine Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. Asisa Volz für ihre Hilfe und die tatkräftige fachliche Unterstützung bei meiner Publikation. Ihre umfassenden Literaturkenntnisse und Korrekturen waren mir immer eine besonders große Hilfe. Vielen Dank für die Hilfe bei der Fertigstellung der Publikation und dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Astrid Freudenstein und Sylvia Jany für die Einführung in die Laborarbeit bedanken und bedanke mich ganz herzlich für ihre Hilfe und Unterstützung. Vielen Dank für euer offenes Ohr bei Unsicherheiten und Fragen.

Einen großen Dank auch an alle Mitarbeiter des Instituts für die gute Zusammenarbeit und den netten Umgang. Besonders hervorzuheben sind dabei Corina Macheel, Nina Hechtberger, Robert Fux, Michael Lehmann, Ursula Klostermeier, Axel Groß und Patrizia Bonert.

Meinen (ehemaligen) Doktorandenkolleginnen und –kollegen – Henni Schwarz, Leonard Limpinsel, Tobias Jäger, Alina Tscherne, Stephanie Riederer, Svenja Veit, Ellen Link, Marlowe Peter, Yang Deng und Liangliang Nan – danke ich für die tolle Zusammenarbeit und die gemeinsame Zeit im Doktorandenzimmer. Georgia Kalodimou danke ich für die schnelle und kompetente Korrektur meiner Publikation.

Ein wahnsinnig großer Dank gilt meiner lieben Familie, besonders meinen herzensguten Eltern, die mich in jeder Lebenslage und Situation liebevollst

unterstützen und immer an mich glauben. Ohne euch und euren Beistand wäre all das (inklusive des Studiums und der wunderschönen Zeit in München) nie möglich gewesen.

Meiner großartigen Schwester Mimi möchte ich dafür danken, dass sie immer für mich da ist, mir ihr offenes Ohr schenkt und mir die beste Schwester ist, die ich mir vorstellen kann. Danke!

Melanie Senti danke ich für ihre unvergleichbar wundervolle Art, mir in jeglicher Situation das Leben zu verschönern, mich zum Lachen zu bringen und mein Dasein in einer Weise zu bereichern, die ich so nie kannte. Danke, dass du immer für mich da warst und ich in jeder Situation auf dich zählen konnte.

Für Hendrik

Der größte aller möglichen Danks geht an meine bessere Hälfte, meine Sonne, meinen Schein, meinen Sonnenschein, Jan Hendrik – Delfin-Zehe – Schwarz, der mich in sämtlichen ausweglosen Situationen aufgefangen, bildlich auf seinen Schultern getragen und mich wieder auf die richtige Bahn gebracht hat, mich nicht nur mit seiner unübertroffenen Eloquenz in den Bann gezogen und gefesselt hat, mich überhaupt erst in diese tolle Doktorandenzeit hier hineingebracht hat, Sublimierung zur Wissenschaft gemacht hat, mich - wie gesagt - nicht nur mit seiner großen Liebe umgarnt hat, mir durch akustische Untermalung in jeglicher Form meinen Laboralltag versüßt hat (Hotspot-Passwort inklusive...), mich nicht nur im Sommer mit Speiseeis und Eis kühl erfrischt hat, mich mit sämtlichen schönen, des Öfteren auch salzigen sowie auch lesenswerten Geschenken überhäuft hat, der mit allen Mitteln versucht hat mehr Farbe in unseren Alltag zu bringen, in diesem Zusammenhang denke ich traurig an unsere Wand zurück, er mein Salz nicht nur in der Suppe war, er nicht nur durch ökologischen Anbau von Kresse versucht hat, Würze in unsere mittäglichen Laugenstangen zu bekommen, mit mir zusammen die Liebe zu Cashew-Nüssen aufleben hat lassen, die Uhren für mich hat schneller laufen lassen, wobei es meiner inneren Uhr dabei mal zu schnell ging, mich mit mütterlichen Backkünsten eingedeckt hat, mich tatsächlich auch mit eigenen unförmigen Backkünsten erfreut hat, mir aber auch mit fabrikfertigen Backkünsten den ein oder anderen Gaumenschmaus kredenzt hat, dazu Sahne ad libitum verteilte, steinerne sowie gläserne Souvenirs mitbrachte, meinem Fahrrad mit dem Seinen einen treuen Freund zur Seite stellte, wir jetzt leider nicht mehr zusammen stundenweise Veros auslegen können, und ich mich an die Zeiten gemeinsamer Elton John Lieder gerne zurückerinnere, er mich und meine panischen „GRÜN“-Rufe unter Einsatz seines Lebens ernst nahm, seinen grünen Daumen ab und an unter Beweis stellte, meine Pflanzen darüber hinaus im Winter kuschelig warm hielt, bei ihm Hopfen und Malz alles aber nicht verloren waren, mitentdeckt hat, dass ein geschwollener Lymphknoten Parallelen mit dem Prinzip der Wissenschaft aufweisen kann, mit mir unter anderem bemerkt hat, dass strukturell ähnlich große Dinge nicht immer gleich groß auftreten, wir uns immer gegenseitig ein offenes

Ohr waren, sei es beruflich oder privat, dass man vieles und viel mehr auf seine starken Schultern abladen konnte, für die Erfindung von DUVZA, dass über seine FACSen selten etwas ging, für die wunderschönen gemeinsamen Wanderausflüge im M-UH-Mobil mit Apachen-Sound, die schönen Stunden gemeinsam mit Horst Schlemmer, für die Erkenntnis, dass Schälen von Obst ab und an auch überflüssig ist, dass wir zusammen E.T. sowie defekte als auch funktionale Kühlschränke und Alligatoren transportiert haben, den Messias gesehen haben, für den weichsten und schönsten aller Teddybären, das gemeinsame Durchstehen und echtes Zusammenhalten sowie unter anderem in diesem Zusammenhang alle Butterblumen und gemeinsamen Mensagänge.

Du warst und bist mir ein wahrer Freund.

In tiefer Dankbarkeit.

Innen. Innen. Innen. Außen. Außen. Außen. Hüfte. Finger. Kniff. Vortex.